



Diogo Filipe da Costa Guerreiro

Licenciatura em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

Validação Analítica dos Métodos de Quantificação num comprimido de Arteméter e Lumefantrina, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Mestre Maria Gabriela da Conceição Leitão Lourenço, Diretora do Departamento de
Direção Técnica e Qualidade, Sofarimex Indústria Química e Farmacêutica, S.A

Coorientador: Professor Doutor Mário Fernando José Eusébio, Professor Auxiliar, Faculdade de
Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Doutora Isabel Maria de Figueiredo Ligeiro da Fonseca, Professora Associado da
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Arguente: Dr.^a Ana Mafalda Ildefonso Barradinhas, Técnica Especialista no Controlo de
Qualidade, Sofarimex Indústria Química e Farmacêutica, S.A

Vogal: Mestre Maria Gabriela da Conceição Leitão Lourenço, Diretora do Departamento de
Direção Técnica e Qualidade, Sofarimex Indústria Química e Farmacêutica, S.A



Setembro de 2017

Diogo Filipe da Costa Guerreiro

Licenciatura em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

Validação Analítica dos Métodos de Quantificação num comprimido de Arteméter e Lumefantrina, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Mestre Maria Gabriela da Conceição Leitão Lourenço, Diretora do Departamento de
Direção Técnica e Qualidade, Sofarimex Indústria Química e Farmacêutica, S.A

Coorientador: Professor Doutor Mário Fernando José Eusébio, Professor Auxiliar, Faculdade de
Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Doutora Isabel Maria de Figueiredo Ligeiro da Fonseca, Professora Associado da
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Arguente: Dr.^a Ana Mafalda Ildefonso Barradinhas, Técnica Especialista no Controlo de
Qualidade, Sofarimex Indústria Química e Farmacêutica, S.A

Vogal: Mestre Maria Gabriela da Conceição Leitão Lourenço, Diretora do Departamento de
Direção Técnica e Qualidade, Sofarimex Indústria Química e Farmacêutica, S.A

Setembro de 2017

“Validação Analítica dos Métodos de Quantificação num comprimido de Arteméter e Lumefantrina, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)” *Copyright* ©, Diogo Filipe da Costa Guerreiro, FCT/UNL e UNL.

Indicação dos direitos de cópia

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

***Copyright* ©**

Faculdade de Ciências e Tecnologia and Universidade Nova de Lisboa have the perpetual right with no geographical boundaries, to archive and publish this dissertation through printed copies reproduced on paper or digital form or by any means known or to be invented, and to divulge through scientific repositories and admit your copy and distribution for educational purposes or research, not commercial, as long as the credit is given to the author and editor.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho representa o fim de um ciclo e o início de outro. No ciclo que agora se fecha, muitas foram as pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para que esta caminhada fosse menos cansativa, com palavras de incentivo, com conversas e ideias que me ajudaram a ver a vida de uma forma diferente. A todas elas agradeço e dedico-lhes este trabalho.

À Doutora Gabriela Lourenço, por ter aceitado ser minha orientadora e, desta forma, me ter dado oportunidade de aprender com a excelente equipa Sofarimex, de uma forma mais adequada e proveitosa, as ferramentas analíticas que se encontram ao nosso dispor.

À Engenheira Susana que me ajudou bastante durante todo o estágio, à Mafalda Barradinhas que me recebeu de braços abertos e me ensinou, não só em como trabalhar e comportar em laboratório, mas também me auxiliou na aplicação da teórica à prática, dando-me oportunidade de aprender com a sua experiência e também por toda a sua paciência e tempo cedido. À Cátia Patrício que foi um braço direito dentro do laboratório sempre disposta a ajudar, e a dar os seus conselhos bastante pertinentes.

Agradeço ainda a toda a equipa Sofarimex no geral, que em algum momento me ajudou a construir e desenvolver a minha dissertação.

Ao Professor Mário Eusébio pelo acompanhamento e ensinamento durante todo o meu percurso académico e pela preocupação nesta fase final.

Aos meus amigos que estão sempre por perto e dispostos a ajudar, mesmo que seja com momentos de descontração. Em especial, agradeço à Natacha Amaral e ao João Pequito Lopes que me deram apoio incondicional.

Um grande obrigado à minha família que neste percurso sempre acreditou nas minhas capacidades e me deu força para continuar nos momentos mais difíceis.

Obrigado aos meus sogros e cunhado pelo apoio no meu percurso com alguns obstáculos, que ficaram mais fáceis de ultrapassar graças a essa ajuda.

Agora quero por fim agradecer às pessoas mais importantes no meu percurso académico, quem esteve sempre lá para mim, nos bons e maus momentos. Que aguentaram a minha falta de paciência e em muitos momentos, que festejaram as minhas conquistas e que me incentivaram quando me viram fracassar. Obrigado Pai, Mãe, Mano e Mónica, são vocês que fazem o meu mundo girar e não só por mim, mas também por vocês fecho este ciclo.

RESUMO

A indústria farmacêutica tem vindo a desenvolver o controlo de qualidade, investindo na validação analítica de produtos, de modo a garantir qualidade ao consumidor. Nesse contexto, o objetivo desta dissertação é fazer a validação analítica dos métodos de análise a usar no controlo de qualidade de um medicamento composto por dois ativos, Arteméter e Lumefantrina, por cromatografia líquida de alta eficiência. Foram validados os métodos de doseamento e de dissolução e desenvolvido o método de substâncias aparentadas. Para validação destes métodos teve-se em conta as *guidelines* da Farmacopeia Europeia e da *International Conference on Harmonization* (ICH).

Para o método de doseamento, em ambos os ativos, o método demonstra-se específico, não apresentando compostos que interfiram com os picos das substâncias ativas, sendo linear, exato, preciso, robusto e estável pelo menos até 30 horas, tempo em que este foi testado.

Para o método de dissolução, cada ativo tem as suas condições, tendo sido testados em separado.

O método de dissolução aplicado ao Arteméter é específico, linear, exato e preciso, não se demonstrando robusto para alterações de pH, temperatura da coluna e mudança de filtro, mostrando-se instável para as primeiras 10 horas estudadas.

O método de dissolução aplicado à Lumefantrina é específico, linear, exato, robusto, nas alterações efetuadas ao método, e estável pelo menos até 30 horas.

Para o método de substâncias aparentadas desenvolvido, com base no procedimento da matéria prima, para Arteméter. O método mostra-se específico, linear, exato, preciso e robusto, perante as alterações feitas ao método.

Através dos testes de stress, fez-se uma comparação entre os ativos, Arteméter e Lumefantrina, de modo a verificar as degradações de cada ativo. Obteve-se que para o Arteméter as degradações são significativas, ao contrário do que acontece na Lumefantrina.

Palavras-chave: Indústria Farmacêutica, Controlo de Qualidade, Validação de Métodos Analíticos, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), Arteméter, Lumefantrina, Doseamento, Dissolução, Substâncias Aparentadas.

ABSTRACT

The pharmaceutical industry has been developing quality control, investing in the analytical validation of products, in order to guarantee quality to the consumer. In this context, the aim of this dissertation is to perform an analytical validation of analysis methods to be used in the quality control of a drug composed of two active substances, Artemether and Lumefantrine, by high performance liquid chromatography. The methods of dosing and dissolution were validated and the method of related substances developed. For validation of these methods, the guidelines of the European Pharmacopoeia and the International Conference on Harmonization (ICH) have been taken into account.

For the assay method, in both active compounds, the method is specific and does not present compounds that interfere with the peaks of the active substances, being linear, accurate, robust and stable for at least 30 hours, as tested.

For the dissolution method, each active has its own conditions and has been tested separately.

The method of dissolution applied to the Artemether is specific, linear, accurate and accurate, not proving to be robust for changes in pH, column temperature or filter change, showing to be unstable for the first 10 hours studied.

The dissolution method applied to Lumefantrine is specific, linear, exact, robust, in the carried-out changes to the method, and stable for at least 30 hours.

For the method of related substances developed, based on the raw material procedure, for Artemether, the method is specific, linear, accurate, accurate and robust, given the changes carried-out.

Through the stress tests, a comparison was made between the assets, Artemether and Lumefantrine, in order to verify the degradations of each one. As a result, the Artemether the degradations are more significant, unlike what happens in the Lumefantrine.

Keywords: Pharmaceutical Industry, Quality Control, Validation of Analytical Methods, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Artemether, Lumefantrine, Assay, Dissolution, Related Substances.

INDICE

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	V
ABSTRACT	VII
INDICE	IX
NOMENCLATURA	XXIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Enquadramento e Motivação	1
1.2. Grupo Azevedos – Sofarimex	2
1.3. Controlo de Qualidade	3
1.4. Cromatografia	4
1.4.1. Cromatografia de camada fina	5
1.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	5
1.4.2.1. Detetor UV-visível	7
1.4.2.2. Detetor de díodo (DAD)	8
1.5. Validação analítica	9
1.5.1. Métodos Analíticos	10
1.5.1.1. Doseamento	10
1.5.1.2. Dissolução	10
1.5.1.3. Substâncias Aparentadas	11
1.5.1.4. Parâmetros de desempenho analíticos	11
1.6. Substâncias Ativas	17
1.6.1. Arteméter	17
1.6.2. Lumefantrina	17
2. MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1. Doseamento (Descrição do Método no Anexo A)	19
2.1.1. Especificidade	19
2.1.2. Linearidade	20
2.1.3. Exatidão sobre o intervalo da linearidade	20
2.1.4. Precisão do Sistema	20
2.1.5. Precisão	21
2.2. Dissolução	22
2.2.1. Dissolução Arteméter (Descrição do Método no Anexo B)	22
2.2.1.1. Especificidade	22
2.2.1.2. Linearidade	22
2.2.1.3. Exatidão sobre o intervalo da linearidade	23
2.2.2. Precisão do Sistema	23

2.2.2.1.	<i>Precisão</i>	24
2.2.2.2.	<i>Robustez</i>	24
2.2.2.3.	<i>Estabilidade</i>	24
2.2.3.	<i>Dissolução Lumefantrina (Descrição do Método no Anexo C)</i>	25
2.2.3.1.	<i>Especificidade</i>	25
2.2.3.2.	<i>Linearidade</i>	25
2.2.3.3.	<i>Exatidão sobre o intervalo da linearidade</i>	26
2.2.3.4.	<i>Precisão do Sistema</i>	26
2.2.3.5.	<i>Precisão</i>	27
2.2.3.6.	<i>Robustez</i>	27
2.2.3.7.	<i>Estabilidade</i>	27
2.3.	<i>Substâncias Aparentadas</i>	28
2.3.1.	<i>Substâncias Aparentadas de Arteméter (Descrição do Método no Anexo D)</i>	28
2.3.1.1.	<i>Especificidade</i>	28
2.3.1.2.	<i>Testes de Stress</i>	29
2.3.1.3.	<i>Linearidade</i>	29
2.3.1.4.	<i>Exatidão sobre o intervalo da linearidade</i>	30
2.3.1.5.	<i>Precisão do Sistema</i>	30
2.3.1.6.	<i>Precisão</i>	30
2.3.1.7.	<i>Limite de Quantificação</i>	31
2.3.1.8.	<i>Robustez</i>	31
2.3.2.	<i>Substâncias Aparentadas de Lumefantrina (Descrição do Método no Anexo E)</i>	32
2.3.2.1.	<i>Especificidade</i>	32
2.3.2.2.	<i>Testes de Stress</i>	32
3.	<i>APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS</i>	33
3.1.	<i>Doseamento</i>	33
3.1.1.	<i>Especificidade</i>	33
3.1.1.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	33
3.1.1.2.	<i>Resultados</i>	33
3.1.1.3.	<i>Conclusão</i>	36
3.1.2.	<i>Linearidade</i>	37
3.1.2.1.	<i>Critérios de aceitação:</i>	37
3.1.2.2.	<i>Resultados Arteméter</i>	37
3.1.2.3.	<i>Resultados Lumefantrina</i>	40
3.1.2.4.	<i>Conclusão</i>	42
3.1.3.	<i>Exatidão sobre o intervalo da linearidade</i>	43
3.1.3.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	43

3.1.3.2.	<i>Resultados Arteméter</i>	43
3.1.3.3.	<i>Resultados Lumefantrina</i>	46
3.1.3.4.	<i>Conclusão</i>	48
3.1.4.	<i>Precisão do Sistema</i>	49
3.1.4.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	49
3.1.4.2.	<i>Resultados</i>	49
3.1.4.3.	<i>Conclusão</i>	49
3.1.5.	<i>Precisão</i>	50
3.1.5.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	50
3.1.5.2.	<i>Resultados Arteméter</i>	50
3.1.5.3.	<i>Resultados Lumefantrina</i>	52
3.1.5.4.	<i>Conclusão</i>	53
3.1.6.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	53
3.1.6.2.	<i>Resultados</i>	53
3.1.6.3.	<i>Conclusão</i>	56
3.1.7.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	57
3.1.7.2.	<i>Resultados</i>	57
3.1.7.3.	<i>Conclusão</i>	57
3.2.	<i>Dissolução</i>	59
3.2.1.	<i>Dissolução Arteméter</i>	59
3.2.1.1.	<i>Especificidade</i>	59
3.2.1.1.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	59
3.2.1.1.2.	<i>Resultados</i>	59
3.2.1.1.3.	<i>Conclusão</i>	61
3.2.1.2.	<i>Linearidade</i>	62
3.2.1.2.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	62
3.2.1.2.2.	<i>Resultados</i>	62
3.2.1.2.3.	<i>Conclusão</i>	64
3.2.1.3.	<i>Exatidão sobre o intervalo da linearidade</i>	65
3.2.1.3.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	65
3.2.1.3.2.	<i>Resultados</i>	65
3.2.1.3.3.	<i>Conclusão</i>	67
3.2.1.4.	<i>Precisão do Sistema</i>	68
3.2.1.4.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	68
3.2.1.4.2.	<i>Resultados</i>	68
3.2.1.4.3.	<i>Conclusão</i>	68
3.2.1.5.	<i>Precisão</i>	69

3.2.1.5.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	69
3.2.1.5.2.	<i>Resultados</i>	69
3.2.1.5.3.	<i>Conclusão</i>	70
3.2.1.6.	<i>Robustez</i>	71
3.2.1.6.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	71
3.2.1.6.2.	<i>Resultados</i>	71
3.2.1.6.3.	<i>Conclusão</i>	73
3.2.1.7.	<i>Estabilidade</i>	75
3.2.1.7.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	75
3.2.1.7.2.	<i>Resultados</i>	75
3.2.1.7.3.	<i>Conclusão</i>	75
3.2.2.	<i>Dissolução Lumefantrina</i>	77
3.2.2.1.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	77
3.2.2.1.2.	<i>Resultados</i>	77
3.2.2.1.3.	<i>Conclusão</i>	79
3.2.2.2.	<i>Linearidade</i>	81
3.2.2.2.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	81
3.2.2.2.2.	<i>Resultados</i>	81
3.2.2.2.3.	<i>Conclusão</i>	83
3.2.2.3.	<i>Exatidão sobre o intervalo da linearidade</i>	85
3.2.2.3.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	85
3.2.2.3.2.	<i>Resultados</i>	85
3.2.2.3.3.	<i>Conclusão</i>	89
3.2.2.4.	<i>Precisão do Sistema</i>	91
3.2.2.4.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	91
3.2.2.4.2.	<i>Resultados</i>	91
3.2.2.4.3.	<i>Conclusão</i>	91
3.2.2.5.	<i>Precisão</i>	93
3.2.2.5.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	93
3.2.2.5.2.	<i>Resultados</i>	93
3.2.2.5.3.	<i>Conclusão</i>	94
3.2.2.6.	<i>Robustez</i>	95
3.2.2.6.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	95
3.2.2.6.2.	<i>Resultados</i>	95
3.2.2.6.3.	<i>Conclusão</i>	96
3.2.2.7.	<i>Estabilidade</i>	97
3.2.2.7.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	97

3.2.2.7.2.	<i>Resultados</i>	97
3.2.2.7.3.	<i>Conclusão</i>	97
3.3.	<i>Substâncias Aparentadas</i>	99
3.3.1.	<i>Substâncias Aparentadas de Arteméter</i>	99
3.3.1.1.	<i>Especificidade</i>	99
3.3.1.1.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	99
3.3.1.1.2.	<i>Resultados</i>	99
3.3.1.1.3.	<i>Conclusão</i>	101
3.3.1.2.	<i>Testes de Stress</i>	103
3.3.1.2.1.	<i>Resultados</i>	103
3.3.1.2.2.	<i>Conclusão</i>	107
3.3.1.3.	<i>Linearidade</i>	109
3.3.1.3.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	109
3.3.1.3.2.	<i>Resultados</i>	109
3.3.1.3.3.	<i>Conclusão</i>	111
3.3.1.4.	<i>Exatidão sobre o intervalo da linearidade</i>	113
3.3.1.4.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	113
3.3.1.4.2.	<i>Resultados</i>	113
3.3.1.4.3.	<i>Conclusão</i>	115
3.3.1.5.	<i>Precisão do Sistema</i>	117
3.3.1.5.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	117
3.3.1.5.2.	<i>Resultados</i>	117
3.3.1.5.3.	<i>Conclusão</i>	117
3.3.1.6.	<i>Precisão</i>	119
3.3.1.6.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	119
3.3.1.6.2.	<i>Resultados</i>	119
3.3.1.6.3.	<i>Conclusão</i>	120
3.3.1.7.	<i>Limite de Quantificação</i>	121
3.3.1.7.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	121
3.3.1.7.2.	<i>Resultados</i>	121
3.3.1.7.3.	<i>Conclusão</i>	121
3.3.1.8.	<i>Robustez</i>	123
3.3.2.	<i>Substâncias Aparentadas de Lumefantrina</i>	125
3.3.2.1.	<i>Especificidade</i>	125
3.3.2.1.1.	<i>Critérios de aceitação</i>	125
3.3.2.1.2.	<i>Resultados</i>	125
3.3.2.1.3.	<i>Conclusão</i>	126

3.3.2.2.	<i>Testes de Stress</i>	127
3.3.2.2.1.	<i>Resultados</i>	127
3.3.2.2.2.	<i>Conclusão</i>	130
4.	CONCLUSÕES	131
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
	ANEXOS	137
A.	<i>Descrição do Método de Doseamento (Confidencial - método descrito nos procedimentos internos da empresa)</i>	137
B.	<i>Descrição do Método de Dissolução de Arteméter (Confidencial - método descrito nos procedimentos internos da empresa)</i>	137
C.	<i>Descrição do Método de Dissolução de Lumefantrina (Confidencial - método descrito nos procedimentos internos da empresa)</i>	137
D.	<i>Descrição do Método de Substâncias Aparentadas e Estudos de Stress de Arteméter (Confidencial - método descrito nos procedimentos internos da empresa)</i>	137
E.	<i>Descrição do Método de Substâncias Aparentadas de Lumefantrina (Confidencial - método descrito nos procedimentos internos da empresa)</i>	137

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.1. Esquema de um HPLC</i>	6
<i>Figura 1.2. Estrutura do Arteméter (Maheshbhai, 2012)</i>	17
<i>Figura 1.3. Estrutura da Lumefantrina (Maheshbhai, 2012)</i>	17
<i>Figura 3.1. Cromatograma solvente. Em cima: 380 nm; em baixo: 210 nm</i>	33
<i>Figura 3.2. Cromatograma placebo. Em cima: 380 nm; em baixo: 210 nm</i>	34
<i>Figura 3.3. Cromatograma padrão de Arteméter. Em cima: 380 nm; em baixo: 210 nm</i>	34
<i>Figura 3.4. Cromatograma padrão de Lumefantrina. Em cima: 380 nm; em baixo: 210 nm</i>	35
<i>Figura 3.5. Cromatograma padrão de trabalho. Em cima: 380 nm; em baixo: 210 nm</i>	35
<i>Figura 3.6. Cromatograma matriz. Em cima: 380 nm; em baixo: 210 nm</i>	36
<i>Figura 3.7. Curva de calibração da linearidade de Arteméter – Doseamento</i>	38
<i>Figura 3.8. Distribuição de resíduos da linearidade de Arteméter – Doseamento</i>	38
<i>Figura 3.9. Curva de calibração da linearidade da Lumefantrina - Doseamento</i>	41
<i>Figura 3.10. Distribuição de resíduos da linearidade de Lumefantrina - Doseamento</i>	41
<i>Figura 3.11. Curva de calibração da exatidão de Arteméter – Doseamento</i>	44
<i>Figura 3.12. Distribuição de resíduos da exatidão de Arteméter - Doseamento</i>	44
<i>Figura 3.13. Curva de calibração da exatidão de Lumefantrina – Doseamento</i>	46
<i>Figura 3.14. Distribuição de resíduos da exatidão de Lumefantrina - Doseamento</i>	47
<i>Figura 3.15. Cromatograma matriz do grupo 1. Em cima: 210 nm; em baixo: 380 nm</i>	55
<i>Figura 3.16. Cromatograma matriz do grupo 7. Em cima: 210 nm; em baixo: 380 nm</i>	56
<i>Figura 3.17. Cromatograma solvente da especificidade de Arteméter – Dissolução</i>	59
<i>Figura 3.18. Cromatograma Placebo da especificidade de Arteméter – Dissolução</i>	60
<i>Figura 3.19. Cromatograma padrão 100% da especificidade de Arteméter – Dissolução</i>	60
<i>Figura 3.20. Cromatograma matriz da especificidade de Arteméter – Dissolução</i>	61
<i>Figura 3.21. Cromatograma do comprimido dissolvido da especificidade de Arteméter – Dissolução</i>	61
<i>Figura 3.22. Curva de calibração da linearidade de Arteméter – Dissolução</i>	63
<i>Figura 3.23. Distribuição de resíduos da linearidade de Arteméter – Dissolução</i>	63
<i>Figura 3.24. Curva de calibração da exatidão de Arteméter – Dissolução</i>	65
<i>Figura 3.25. Distribuição de resíduos da exatidão de Arteméter – Dissolução</i>	66
<i>Figura 3.26. Cromatograma Grupo 1 da Robustez de Arteméter - Dissolução</i>	72
<i>Figura 3.27. Cromatograma Grupo 2 da Robustez de Arteméter – Dissolução</i>	72
<i>Figura 3.28. Cromatograma Grupo 5 da Robustez de Arteméter - Dissolução</i>	72
<i>Figura 3.29. Cromatograma Grupo 6 da Robustez de Arteméter – Dissolução</i>	73
<i>Figura 3.30. Cromatograma Grupo 10 da Robustez de Arteméter – Dissolução</i>	73
<i>Figura 3.31. Cromatograma solvente da especificidade de Lumefantrina – Dissolução</i>	77

<i>Figura 3.32. Cromatograma placebo da especificidade de Lumefantrina – Dissolução</i>	<i>77</i>
<i>Figura 3.33. Cromatograma padrão 100% da especificidade de Lumefantrina – Dissolução.....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 3.34. Cromatograma matriz da especificidade de Lumefantrina – Dissolução.....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 3.35. Cromatograma do comprimido dissolvido da especificidade de Lumefantrina – Dissolução</i>	<i>78</i>
<i>Figura 3.36. Curva de calibração da linearidade de Lumefantrina – Dissolução</i>	<i>82</i>
<i>Figura 3.37. Distribuição de resíduos da linearidade de Lumefantrina – Dissolução</i>	<i>82</i>
<i>Figura 3.38. Cromatograma matriz 100% no 1º ensaio da linearidade de Lumefantrina com uma área de 635524 mAU.s – Dissolução.....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 3.39. Cromatograma matriz 100% no 2º ensaio da linearidade de Lumefantrina com uma área de 968146 mAU.s – Dissolução.....</i>	<i>86</i>
<i>Figura 3.40. Curva de calibração da exatidão de Lumefantrina - Dissolução</i>	<i>87</i>
<i>Figura 3.41. Distribuição de resíduos da exatidão de Lumefantrina – Dissolução.....</i>	<i>87</i>
<i>Figura 3.42. Cromatograma Grupo 1 da Robustez de Lumefantrina – Dissolução</i>	<i>96</i>
<i>Figura 3.43. Cromatograma Grupo 8 da Robustez de Lumefantrina – Dissolução</i>	<i>96</i>
<i>Figura 3.44. Cromatograma solvente de Arteméter - Substâncias Aparentadas.....</i>	<i>99</i>
<i>Figura 3.45. Cromatograma placebo de Arteméter – Substâncias Aparentadas.....</i>	<i>99</i>
<i>Figura 3.46. Cromatograma padrão 100% de Arteméter – Substâncias Aparentadas</i>	<i>100</i>
<i>Figura 3.47. Cromatograma padrão de dihidroartemesinina – Substâncias Aparentadas</i>	<i>100</i>
<i>Figura 3.48. Cromatograma de α-arteméter</i>	<i>100</i>
<i>Figura 3.49. Cromatograma matriz de Arteméter – Substâncias Aparentadas.....</i>	<i>101</i>
<i>Figura 3.50. Cromatograma s/ataque t_0 de Arteméter – Substâncias Aparentadas.....</i>	<i>104</i>
<i>Figura 3.51. Cromatograma stress ácido t_0 de Arteméter – Substâncias Aparentadas.....</i>	<i>104</i>
<i>Figura 3.52. Cromatograma stress básico t_0 de Arteméter – Substâncias Aparentadas</i>	<i>104</i>
<i>Figura 3.53. Cromatograma stress oxidação t_0 de Arteméter – Substâncias Aparentadas</i>	<i>105</i>
<i>Figura 3.54. Cromatograma stress calor 48 horas t_0 de Arteméter – Substâncias Aparentadas</i>	<i>105</i>
<i>Figura 3.55. Cromatograma stress luz 48 horas t_0 de Arteméter – Substâncias Aparentadas.....</i>	<i>105</i>
<i>Figura 3.56. Cromatograma 3D s/ataque t_0 de Arteméter – Substâncias Aparentadas</i>	<i>106</i>
<i>Figura 3.57. Cromatograma 3D stress oxidação t_0 de Arteméter – Substâncias Aparentadas.....</i>	<i>107</i>
<i>Figura 3.58. Curva de calibração da linearidade de Arteméter – Substâncias Aparentadas.....</i>	<i>110</i>
<i>Figura 3.59. Distribuição de resíduos da linearidade de Arteméter – Substâncias Aparentadas.....</i>	<i>110</i>
<i>Figura 3.60. Curva de calibração da exatidão de Arteméter – Substâncias Aparentadas</i>	<i>114</i>
<i>Figura 3.61. Distribuição de resíduos da exatidão de Arteméter – Substâncias Aparentadas</i>	<i>114</i>
<i>Figura 3.62. Cromatograma Grupo 1 da Robustez de Arteméter – Substâncias Aparentadas</i>	<i>123</i>
<i>Figura 3.63. Cromatograma Grupo 4 da Robustez de Arteméter – Substâncias Aparentadas</i>	<i>124</i>
<i>Figura 3.64. Cromatograma solvente de Lumefantrina – Substâncias Aparentadas.....</i>	<i>125</i>
<i>Figura 3.65. Cromatograma placebo de Lumefantrina – Substâncias Aparentadas</i>	<i>125</i>

<i>Figura 3.66. Cromatograma padrão 100% de Lumefantrina – Substâncias Aparentadas.....</i>	<i>126</i>
<i>Figura 3.67. Cromatograma padrão de Epóxido – Substâncias Aparentadas.....</i>	<i>126</i>
<i>Figura 3.68. Cromatograma padrão de DDFE – Substâncias Aparentadas</i>	<i>126</i>
<i>Figura 3.69. Cromatograma s/ataque t_0 de Lumefantrina – Substâncias Aparentadas</i>	<i>128</i>
<i>Figura 3.70. Cromatograma stress ácido t_0 de Lumefantrina - Substâncias Aparentadas.....</i>	<i>128</i>
<i>Figura 3.71. Cromatograma stress básico t_0 de Lumefantrina - Substâncias Aparentadas</i>	<i>128</i>
<i>Figura 3.72. Cromatograma stress oxidação t_0 de Lumefantrina - Substâncias Aparentadas.....</i>	<i>129</i>
<i>Figura 3.73. Cromatograma stress calor 24 horas t_0 de Lumefantrina – Substâncias Aparentadas..</i>	<i>129</i>
<i>Figura 3.74. Cromatograma stress luz 24 horas t_0 de Lumefantrina – Substâncias Aparentadas</i>	<i>129</i>

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 2.1. Composição das soluções</i>	<i>19</i>
<i>Tabela 2.2. Composição das Soluções de Arteméter e de Lumefantrina - Doseamento.....</i>	<i>20</i>
<i>Tabela 2.3. Composição das soluções da exatidão - Doseamento.....</i>	<i>20</i>
<i>Tabela 2.4. Sequência de trabalho da precisão</i>	<i>21</i>
<i>Tabela 2.5. Composição das soluções</i>	<i>22</i>
<i>Tabela 2.6. Composição das Soluções de Arteméter – Dissolução.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabela 2.7. Composição das soluções da exatidão de Arteméter – Dissolução.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabela 2.8. Sequência de trabalho da precisão</i>	<i>24</i>
<i>Tabela 2.9. Composição das soluções</i>	<i>25</i>
<i>Tabela 3.42. Composição das Soluções de Lumefantrina - Dissolução</i>	<i>25</i>
<i>Tabela 2.11. Composição das soluções da exatidão de Lumefantrina – Dissolução</i>	<i>26</i>
<i>Tabela 2.12. Sequência de trabalho da precisão</i>	<i>27</i>
<i>Tabela 2.13. Composição das soluções – Substâncias Aparentadas.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabela 2.14. Composição de soluções de Arteméter</i>	<i>29</i>
<i>Tabela 2.15. Composição das matrizes da exatidão de Arteméter – Substâncias Aparentadas.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabela 2.16. Sequência de trabalho da precisão</i>	<i>30</i>
<i>Tabela 2.17 – Composição das soluções – substâncias aparentadas.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabela 3.1. Concentração das soluções e Áreas obtidas da Linearidade de Arteméter - Doseamento</i>	<i>37</i>
<i>Tabela 3.2. Análise de variância da Linearidade de Arteméter - Doseamento</i>	<i>39</i>
<i>Tabela 3.3. Testes estatísticos da linearidade de Arteméter - Doseamento</i>	<i>39</i>
<i>Tabela 3.4. Concentração das soluções e Áreas obtidas da Linearidade de Lumefantrina - Doseamento</i>	<i>40</i>
<i>Tabela 3.5. Análise de variância da linearidade da Lumefantrina - Doseamento.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabela 3.6. Testes estatísticos da linearidade da Lumefantrina - Doseamento.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabela 3.7. Concentrações, Áreas e Recuperação média das soluções usadas para o estudo da exatidão de Arteméter - Doseamento</i>	<i>43</i>
<i>Tabela 3.8. Análise de variância da exatidão de Arteméter - Doseamento</i>	<i>45</i>
<i>Tabela 3.9. Testes estatísticos da exatidão de Arteméter - Doseamento</i>	<i>45</i>
<i>Tabela 3.10. Recuperação média da exatidão de Lumefantrina - Doseamento</i>	<i>46</i>
<i>Tabela 3.11. Análise de variância da exatidão de Lumefantrina - doseamento.....</i>	<i>47</i>
<i>Tabela 3.12. Testes estatísticos da exatidão de Lumefantrina - doseamento</i>	<i>48</i>
<i>Tabela 3.13. Resultados da Repetibilidade do Sistema para Arteméter - Doseamento.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabela 3.14. Resultados da Repetibilidade do Sistema para Lumefantrina - Doseamento</i>	<i>49</i>
<i>Tabela 3.15. Quantidade em mg/comp teórico vs obtido para Arteméter - Doseamento.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabela 3.16. Análise de variância da precisão de Arteméter – Doseamento</i>	<i>51</i>
<i>Tabela 3.17. Peso da amostra vs peso obtido para Lumefantrina – Doseamento</i>	<i>52</i>

<i>Tabela 3.18. Análise de variância da precisão de Lumefantrina – Doseamento.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabela 3.19. Resultados de robustez para Arteméter – Doseamento.....</i>	<i>54</i>
<i>Tabela 3.20. Resultados de robustez para Lumefantrina – Doseamento.....</i>	<i>55</i>
<i>Tabela 3.21. Resultados de estabilidade para Arteméter – Doseamento.....</i>	<i>57</i>
<i>Tabela 3.22. Resultado de estabilidade para Lumefantrina – Doseamento.....</i>	<i>57</i>
<i>Tabela 3.23. Concentração das soluções e Áreas obtidas da Linearidade de Arteméter - Dissolução</i>	<i>62</i>
<i>Tabela 3.24. Análise de variância da linearidade de Arteméter – Dissolução.....</i>	<i>64</i>
<i>Tabela 3.25. Testes estatísticos da linearidade de Arteméter – Dissolução.....</i>	<i>64</i>
<i>Tabela 3.26. Concentração, Áreas e Recuperação média da exatidão de Arteméter – Dissolução</i>	<i>65</i>
<i>Tabela 3.33. Análise de variância da exatidão de Arteméter – Dissolução.....</i>	<i>66</i>
<i>Tabela 3.34. Testes estatísticos da exatidão de Arteméter – Dissolução.....</i>	<i>67</i>
<i>Tabela 3.35. Resultados da Repetibilidade do Sistema para Arteméter – Dissolução.....</i>	<i>68</i>
<i>Tabela 3.30. Concentração das soluções e Áreas obtidas da Precisão de Arteméter – Dissolução....</i>	<i>69</i>
<i>Tabela 3.31. Análise de variância da precisão de Arteméter – Dissolução.....</i>	<i>70</i>
<i>Tabela 3.32. Resultados obtidos da robustez de Arteméter – Dissolução.....</i>	<i>71</i>
<i>Tabela 3.40. Resultados de estabilidade das soluções para Arteméter - dissolução</i>	<i>75</i>
<i>Tabela 3.34. Concentração das soluções e Áreas obtidas da Linearidade de Lumefantrina – Dissolução</i>	<i>81</i>
<i>Tabela 3.35. Análise de variância da linearidade de Lumefantrina – Dissolução</i>	<i>83</i>
<i>Tabela 3.36. Testes estatísticos da linearidade de Lumefantrina - Dissolução.....</i>	<i>83</i>
<i>Tabela 3.37. Concentração, Áreas e Recuperação média da exatidão de Lumefantrina - Dissolução</i>	<i>86</i>
<i>Tabela 3.38. Análise de variância da exatidão de Lumefantrina - Dissolução</i>	<i>88</i>
<i>Tabela 3.39. Testes estatísticos da exatidão de Lumefantrina – Dissolução.....</i>	<i>89</i>
<i>Tabela 3.40. Resultados da Repetibilidade do Sistema para Lumefantrina - Dissolução</i>	<i>91</i>
<i>Tabela 3.41. Concentração das soluções e Áreas obtidas da Precisão de Lumefantrina - Dissolução</i>	<i>93</i>
<i>Tabela 3.42. Análise de variância da precisão de Lumefantrina - Dissolução</i>	<i>94</i>
<i>Tabela 3.43. Resultados de robustez para Lumefantrina – Dissolução.....</i>	<i>95</i>
<i>Tabela 3.44. Resultados de estabilidade para Lumefantrina - Dissolução.....</i>	<i>97</i>
<i>Tabela 3.45. Resultados de testes de stress de Arteméter – Substâncias Aparentadas</i>	<i>103</i>
<i>Tabela 3.46. Resultados de pureza obtidos dos testes de stress de Arteméter – Substâncias Aparentadas</i>	<i>106</i>
<i>Tabela 3.47. Concentração das soluções e Áreas obtidas da linearidade de Arteméter – Substâncias Aparentadas.....</i>	<i>109</i>
<i>Tabela 3.48. Análise de Variância da Linearidade de Arteméter – Substâncias Aparentadas</i>	<i>111</i>
<i>Tabela 3.49. Análises estatísticas da linearidade de Arteméter – Substâncias Aparentadas.....</i>	<i>111</i>
<i>Tabela 3.50. Recuperação média da exatidão de Arteméter – Substâncias Aparentadas</i>	<i>113</i>
<i>Tabela 3.51. Análise de variância da exatidão de Arteméter – Substâncias Aparentadas</i>	<i>115</i>

<i>Tabela 3.52. Testes estatísticos da exatidão de Arteméter – Substâncias Aparentadas.....</i>	<i>115</i>
<i>Tabela 3.53. Resultados da Repetibilidade do Sistema para Arteméter – Substâncias Aparentadas</i>	<i>117</i>
<i>Tabela 3.54. Áreas obtidas da por solução injetada na precisão de Arteméter – Substâncias Aparentadas.....</i>	<i>119</i>
<i>Tabela 3.55. Análise de variância da precisão de Arteméter – Substâncias Aparentadas.....</i>	<i>120</i>
<i>Tabela 3.56. Resultados do limite de quantificação de Arteméter – Substâncias Aparentadas</i>	<i>121</i>
<i>Tabela 3.57. Resultados de robustez para Arteméter – Substâncias Aparentadas</i>	<i>123</i>
<i>Tabela 3.58. Resultados de testes de stress de Lumefantrina - Substâncias Aparentadas.....</i>	<i>127</i>
<i>Tabela 4.1. Resumo da Validação Analítica.....</i>	<i>131</i>

NOMENCLATURA

ICH

International Conference on Harmonization

INFARMED

Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento

HPLC

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

High Performance Liquid Chromatography

DAD

Detetor de diodo

GF/C

Fibra de Vidro tipo C

PVDF

Fluoreto de Polivinilideno

LQ

Limite de Quantificação

ACN

Acetonitrilo

r

Coeficiente de correlação

r^2

Coeficiente de determinação

SI^2

Variância consoante a regressão

SR^2

Variância Residual

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enquadramento e Motivação

Atualmente, as indústrias farmacêuticas representam uma grande percentagem da economia no setor farmacêutico (Isse, 2011). Este ramo sofreu grandes alterações nos últimos anos devido à globalização intensiva e ao aumento da competitividade. As indústrias farmacêuticas têm procurado vencer novos desafios de forma a destacarem-se no mercado global. Assim, a satisfação e o grau de confiança do consumidor são fatores importantes que têm recebido cada vez mais atenção durante a produção do medicamento (Kesič, 2009).

Com base neste desenvolvimento, a realização do controlo de qualidade nas indústrias farmacêuticas é um dos fatores mais importantes para garantir a qualidade, a segurança, a eficácia e a credibilidade dos seus medicamentos para com o mercado consumidor.

De modo a garantir esses requisitos durante a fabricação dos seus produtos, as indústrias farmacêuticas precisam de cumprir determinadas regras e leis impostas pelas agências de regulamentação e garantia de qualidade dos produtos. Em Portugal, a agência designada para esse feito é o Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento (INFARMED), que tem o dever de regular e supervisionar os setores dos medicamentos e produtos de saúde (entre eles dispositivos médicos, produtos de cosméticos e de higiene corporal), segundo os mais elevados padrões de proteção da saúde pública, assegurando assim a sua qualidade, eficácia e segurança e garantindo o seu acesso aos cidadãos e profissionais da saúde (Infarmed, 2016).

De facto, o departamento de qualidade nas indústrias farmacêuticas tem cada vez mais importância na fabricação de um medicamento (Kesič, 2009). Nesse contexto, o objetivo desta dissertação é fazer a validação analítica dos métodos para análise em controlo de qualidade de um medicamento composto de dois ativos anteriormente validados em matéria-prima.

1.2. Grupo Azevedos – Sofarimex

O Grupo Azevedos foi fundado em 1775 sendo um estabelecimento da botica Azevedo. Inscreveram na sua história a produção do primeiro medicamento em Portugal e a participação no prémio Nobel da Medicina atribuído ao Professor Egas Moniz.

Em 1994, o Grupo Azevedos inaugurou a Sofarimex que, atualmente, é a empresa líder de fabrico de medicamentos em Portugal. Tem um portfólio superior a 650 produtos e exporta para os cinco continentes 75% dos produtos fabricados (Azevedos, 2016b). A Sofarimex é um dos maiores produtores ibéricos de liofilizados, tendo uma capacidade atual de 9 milhões de unidades/ano (Azevedos, 2016a).

A produção de liofilizados é um processo com grandes vantagens na qualidade dos medicamentos, mas é também o de maior exigência tecnológica para as empresas produtoras. Os elevados custos do investimento e a manutenção dos equipamentos, assim como os requisitos de qualidade do ar e a qualificação das equipas de trabalho, são válidas justificações para o alto nível de procura que o mercado dirige a esta forma farmacêutica com vantagens acrescidas. Uma unidade de produção que é o estado de arte no sector, satisfaz amplamente estas exigências e dá resposta às necessidades do mercado.

A empresa investe no seu desenvolvimento de modo a permitir o crescimento do negócio e a colocar no mercado produtos de grande qualidade. Para isso tem um laboratório de desenvolvimento galénico que mimetiza as valências da unidade industrial e possui uma equipa de trabalho dedicada ao desenvolvimento de fórmulas, processos de fabrico tanto para novos produtos como para transferência de tecnologia. Existe ainda um laboratório analítico dedicado ao desenvolvimento e validação de métodos analíticos e ensaios de estabilidade.

A Sofarimex oferece uma vasta gama de serviços (Azevedos, 2016c):

- Produção e embalagem de produtos farmacêuticos;
- Aprovisionamento;
- Desenvolvimento de embalagens;
- Desenvolvimento de fórmulas e processos;
- Ensaios de estabilidade;
- Desenvolvimento e validação de métodos analíticos;
- Apoio regulamentar.

1.3. Controlo de Qualidade

O Controlo de Qualidade é responsável pela análise de matérias-primas, e de material de acondicionamento e produto acabado assegurando a qualidade em todas as fases do processo produtivo, desde o desenvolvimento e a validação de métodos físico-químicos e microbiológicos até à realização de estudos de estabilidade de acordo com as normas aplicáveis (EDOL, 2016)

É um conjunto de operações que vai desde a programação, à coordenação e execução com o objetivo de verificar e assegurar que os produtos estejam dentro dos padrões de qualidade exigidos, sempre através de análises e medições. As suas principais vantagens são (Jorge, 2006):

- Otimização de processos;
- Redução de tempos e desperdícios,
- Padronização de procedimentos;
- Aumento do grau de certeza da qualidade do ambiente e dos produtos finais.

A realização do controlo de qualidade nas indústrias farmacêuticas é de extrema importância para que a qualidade, a segurança, a eficácia e a credibilidade dos seus produtos sejam asseguradas junto da população que irá consumir estes medicamentos (Barbosa, 2001; Gennaro, 2004). Este termo diz respeito ao processo de fabrico de um medicamento perfeito de acordo com um conjunto de normas e leis cuja implementação sugere a obrigação de um empenho organizado de todos os funcionários, a fim de evitar erros ou eliminar equívocos em cada uma das fases da produção (Lachman, Liberman, & Kanig, 2001).

A credibilidade do medicamento industrializado exige a qualificação do profissional responsável, a modernidade das indústrias, qualidade dos serviços e segurança dos produtos (Pinto, Kaneko, & Ohara, 2003).

Para a fabricação de um medicamento, é necessário ter em conta um determinado conjunto das mais diversas tecnologias. É essencial, durante as etapas do processo, a realização de vários ensaios que comprovem a qualidade do produto e, é nesse momento que os funcionários da área de controlo de qualidade atuam. Estes ensaios são realizados a partir do momento em que a matéria-prima chega à indústria, onde se verifica a identidade e a pureza da matéria-prima, impedindo a probabilidade de se tratar de um medicamento falsificado.

No decorrer das demais etapas de produção, são feitos outros ensaios que servem como controlo do processo. Por fim, são realizados mais ensaios que aferem desde a embalagem até a dose exata do princípio ativo (Aiache, Aiache, & Renoux, 1998). Também são atribuídas ao controlo de qualidade na indústria farmacêutica as seguintes funções: desenvolver, constituir, alterar e treinar metodologias analíticas e operações de laboratório fundamentadas em referências oficialmente reconhecidas e a realização de estudos internos de validação de métodos (Santoro, 1998).

1.4. Cromatografia

Devido à facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação de espécies químicas, a cromatografia ocupa um lugar de destaque entre os métodos analíticos modernos, podendo ser utilizada isoladamente ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise (Degani, Cass, & Vieira, 1998).

Sendo a cromatografia um método físico-químico, esta fundamenta-se na migração diferencial dos componentes de uma mistura, o que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, sendo uma fase fixa que tem uma grande área superficial chamada fase estacionária, e a outra um fluido que se move através da fase estacionária, designada por fase móvel (Lanças, 1993; Neto & Nunes, 2003).

Atribuída ao botânico russo Mikhael Semenovich Tswett, a descoberta da cromatografia como técnica analítica ocorreu em 1906, quando Tswett descreveu a sua experiência na separação dos componentes de extrato de folhas. Neste estudo, o botânico conseguiu separar pigmentos de cloroplastos em folhas verdes de plantas, onde usou uma coluna de vidro recheada com carbonato de cálcio como fase estacionária e éter de petróleo como fase móvel, ocorrendo a separação de componentes em faixas coloridas. Este acontecimento deu origem ao nome de cromatografia (*chrom* = cor e *grafie* = escrita), embora o processo não dependa da cor. Apesar de investigações semelhantes terem sido desenvolvidas, Tswett foi o primeiro a compreender e a interpretar este processo como é aceite atualmente, utilizando o termo cromatografia para descrever as zonas coloridas que se moviam dentro da coluna (Lanças, 1993).

A técnica cromatográfica foi praticamente ignorada até a década de 1930, quando foi redescoberta por Kuhn e Lederer, que aperfeiçoaram a cromatografia em coluna, separando e identificando as xantofilas da gema de ovo, utilizando para isso uma montagem semelhante à de Tswett, com carbonato de cálcio como fase estacionária e éter de petróleo como fase móvel. A partir daí, a cromatografia foi aperfeiçoada e, em conjunto com os avanços tecnológicos, foi levada a um alto grau de sofisticação, resultando no seu grande potencial de aplicação em muitas áreas (Degani et al., 1998; Neto & Nunes, 2003).

A classificação dos métodos cromatográficos pode ser quanto ao mecanismo de separação, quanto à técnica utilizada e em relação ao tipo de fase utilizada. No entanto, a classificação mais popular é a que tem em consideração o tipo de superfície na qual ocorre a separação, sendo dividida em cromatografia em coluna e em cromatografia planar (Neto & Nunes, 2003).

1.4.1. Cromatografia de camada fina

A cromatografia em camada fina, sistema de cromatografia planar, é uma ferramenta para análises qualitativas rápidas e extremamente efetiva e vantajosa para esse propósito. Adequa-se também para o isolamento de pequenas quantidades de frações de misturas complexas ou na purificação de substâncias.

A fase estacionária é constituída por um sólido finamente dividido que reveste um material de suporte rígido e inerte, de modo que o processo de separação ocorre numa superfície plana, essencialmente bidimensional. Este conjunto denomina-se por placa de cromatografia.

A cromatografia desenvolve-se com a fase móvel, migrando através da fase estacionária por ação da capilaridade. A este processo chama-se de corrida. Como a amostra interage com a fase móvel e a fase estacionária, à medida que o solvente vai ascendendo na placa a amostra vai sendo arrastada pelo solvente a uma velocidade que depende da atração do soluto pela fase estacionária. Assim, diferentes solutos com diferentes interações com a fase estacionária são arrastados a velocidades diferentes, o que permite uma identificação dos mesmos (Degani et al., 1998).

A separação consiste no deslocamento diferencial sobre uma camada fina de adsorvente retido sobre uma superfície plana. O processo de separação fundamenta-se na adsorção, mas quando são utilizadas as fases estacionárias tratadas pode ocorrer partição ou troca iónica, podendo então ser utilizada tanto na separação de substâncias hidrofóbicas como hidrofílicas (Neto & Nunes, 2003).

1.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Na cromatografia em coluna, o sistema mais utilizado em indústria farmacêutica é a cromatografia líquida de alta eficiência, uma vez que tem a capacidade de separar, identificar e quantificar os compostos presentes em determinada mistura. O seu principal objetivo é separar individualmente os diversos constituintes de uma mistura por meio de uma interação entre as moléculas da amostra e de duas fases, uma estacionária e outra móvel.

Os seus principais componentes são um sistema de bombas, um sistema de injeção da amostra, a coluna cromatográfica, o detetor e um sistema que permite registar e fazer o tratamento da resposta analítica do detetor – *software* e computador, como se verifica na figura 1.1.



Figura 1.1. Esquema de um HPLC

Na cromatografia líquida de alta eficiência, o circuito é fechado, podendo ser utilizada inúmeras vezes. As colunas utilizadas são bastante eficientes, no entanto oferecem resistência ao fluxo de fase móvel, necessitando da aplicação de sistemas de bombas de alta pressão, que fazem com que a velocidade da eluição aumente. As análises são mais precisas, uma vez que o fluxo de fase móvel é facilmente controlado e a injeção é feita com microseringas ou através de válvulas de injeção e podem ser utilizados diferentes tipos de detetores.

Este método tem uma alta resolução, sensibilidade e reprodutibilidade, mas dispõe de equipamentos caros e de um elevado custo de manutenção e operação (Skoog, Holler, & Nieman, 2002; Vogel, 2002).

No HPLC, as amostras não precisam ser voláteis nem termicamente estáveis, basta que sejam solúveis na fase móvel, tendo por isso uma maior aplicação. A amostra interage com as duas fases, o que faz com que tenha grande variedade de mecanismos de separação (Guimarães & Collins, 1997; Skoog et al., 2002).

O sistema de bombas tem como função promover a circulação da fase móvel a um determinado fluxo, ao longo de todo o sistema cromatográfico, podendo ser programado para efetuar a introdução dos componentes da fase móvel em proporções variáveis, chamada de eluição em gradiente, ou a uma proporção constante, designando-se neste caso eluição isocrática. A fase móvel flui continuamente através do sistema, arrastando a amostra injetada pelo sistema de injeção, através da fase estacionária constituída pela coluna cromatográfica.

As substâncias presentes na amostra, devido às suas distintas estruturas moleculares e grupos funcionais, dispõem de distintos graus de afinidade com as fases móvel e estacionária e, por conseguinte, as suas velocidades de migração serão igualmente distintas, permitindo o desenvolvimento da separação cromatográfica. Pode-se, então, concluir que a substância com maior afinidade com a coluna é aquela que elui por último e, por oposição, a substância que elui em primeiro lugar será a de menor afinidade com a fase estacionária (Collins, 1997; Dutra de Oliveira, 1989).

As diferentes interações que ocorrem na coluna cromatográfica podem ser classificadas como partição, adsorção, exclusão ou troca iônica. A classificação da separação deve-se aos diferentes tipos de enchimento na coluna cromatográfica, pelo que a sua seleção para uma determinada análise influencia significativamente o método de separação, podendo este ser afetado tanto na seletividade como na eficiência de separação.

A separação pode ser feita por fase normal ou por fase reversa, de acordo com a polaridade das fases de separação do sistema. Em fase normal, a fase estacionária é polar (normalmente o enchimento é composto de sílica) e a fase móvel apolar. Neste caso, os analitos polares ficam retidos mais tempo na coluna, enquanto os analitos com menor polaridade têm mais afinidade pela fase móvel, sendo eluídos mais rapidamente da coluna cromatográfica (Neto & Nunes, 2003).

Na fase reversa, a fase móvel é polar e a fase estacionária é apolar (geralmente utiliza-se sílica modificada quimicamente com cadeias de hidrocarbonetos, vulgarmente chamadas de colunas C8 e C18, classificadas consoante o número de hidrocarbonetos adicionados à estrutura base de sílica), sendo neste caso os compostos menos polares, os mais retidos na coluna. Este último tipo de separação é o que tem uma maior gama de aplicabilidade.

Ao sair da coluna, os componentes seguem para o detetor que deve ser escolhido de modo a ter sensibilidade para registar as diferentes variações de sinal das concentrações dos analitos que são separados pelo sistema. Existem vários tipos de detetores e a escolha dependerá fortemente das características químicas ou físicas das espécies a serem detetadas. Os detetores de HPLC devem possuir várias características, entre elas a alta sensibilidade, a seletividade, a linearidade (correspondente ao aumento da concentração do analito), pouca sensibilidade às variações de temperatura e fluxo preciso e com reprodutibilidade (Guimarães & Collins, 1997).

1.4.2.1. Detetor UV-visível

Os detetores de UV-visível são os detetores mais utilizados em HPLC, pois apresentam um baixo custo, aceitam o uso de gradiente e, geralmente, não são afetados por pequenas mudanças de fluxo e temperatura. Consistem num fotómetro que mede a absorção de luz pelos compostos, em certo comprimento de onda, compreendido entre as regiões visível e ultravioleta.

O princípio da detecção por UV-vis pode ser definido através da concentração do analito relacionada à fração da luz transmitida pela célula do detetor pela lei de Lambert-Beer:

$$A = b \times c \times \varepsilon$$

Equação 1.1. Lambert-Beer

Onde:

A - Absorbância;

ε - Coeficiente de absorção molar da espécie em estudo;

b - Distância percorrida pela radiação através da solução;

c - Concentração molar da espécie em solução.

1.4.2.2. Detetor de díodo (DAD)

Existe uma grande diferença prática entre um detetor de comprimento de onda único ou múltiplo e um detetor de matriz de díodo de varrimento real. Para se desenvolver um método de HPLC ou para operar num ambiente regulado, um tipo de detetor de UV/VIS de díodo (DAD) é geralmente a melhor escolha como detetor primário de HPLC.

Um único detetor de comprimento de onda é de muito pouco valor no desenvolvimento do método HPLC. O principal motivo para isso é o facto de um DAD poder sempre ser configurado para o varrimento de um intervalo de todos os comprimentos de onda prováveis, algo que um detetor único (ou multi-comprimento de onda) não pode.

Usando um único detetor de comprimento de onda para o método estudado, dificilmente se saberá quais as amostras que estão presentes ou mesmo se o pico detetado é o correto. Os dados gerados por um DAD de configuração correta podem alertar para possíveis impurezas novas ou existentes, alterações no produto, mudanças no método, ajudando a desenvolver métodos HPLC adequados.

1.5. Validação analítica

Um dos principais requisitos em qualquer tipo de processo que envolva análises químicas é a obtenção de dados de qualidade que alcancem os objetivos propostos. Nesse sentido, a validação de métodos analíticos tem como objetivo garantir que a metodologia analítica seja exata, precisa, estável, reprodutível e flexível sobre uma faixa específica de uma substância em análise. A validação de um método analítico confere uma garantia de qualidade operacional e de desempenho analítico. Assim, é necessário garantir que as análises de rotina reproduzam valores consistentes ao valor de referência (LSS, 2009). Através deste processo, pretende-se demonstrar que o método analítico em causa é adequado para a análise da amostra a que vai ser sujeito. Mesmo sendo moroso, este processo é grande importância para a credibilidade do método analítico desenvolvido (Taylor, 1987).

Um método de ensaio é um processo que envolve manipulações suscetíveis de acumular erros (sistemáticos e/ou aleatórios), podendo assim, em algumas situações, alterar de forma significativa o valor do resultado final. É, por isso, fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos, de forma a demonstrar através do processo de validação que os métodos internos de ensaio que executam conduzem a resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida. A validação é importante, não só para os laboratórios ou instituições como para os clientes destes, na medida em que é fundamental saber selecionar o método que melhor se adapta a cada análise, assegurando a validade dos resultados (Leite, 2008).

Resultados não fiáveis podem colocar em causa a metodologia e, consequentemente, a saúde do comprador. Desta forma, e para um controlo efetivo dos resultados e de modo a garantir a correta interpretação e confiabilidade dos mesmos, o método analítico é sujeito a uma série de etapas de avaliação, que garantem a sua validação (Huber, 2010; McPolin, 2009).

1.5.1. Métodos Analíticos

1.5.1.1. Doseamento

O doseamento dos ativos e de outros componentes nas diferentes formas galénicas podem ser feitos por diferentes métodos. A sua escolha deve ser criteriosa, sem falhas e deve gerar resultados fidedignos. Deste modo, são considerados certos aspetos, como o tempo de análise do produto, o custo da utilização desse método, a exatidão e a precisão. Consoante os dados gerados, a análise pode ser aproximada (indicando a quantidade de cada analito na amostra), parcial (determinando alguns constituintes da amostra) ou completa (determinando a proporção de cada composto da amostra).

Na sua generalidade, a indústria farmacêutica utiliza métodos cromatográficos de doseamento. Este tem como principal objetivo quantificar a substância ativa presente na amostra e apresenta como vantagens uma grande sensibilidade, rapidez da análise e a possibilidade de aplicação do método em amostras de concentrações muito pequenas (BioPharm, 2017).

1.5.1.2. Dissolução

A dissolução foi desenvolvida de forma a avaliar a performance do medicamento em estudo, de forma sistematizada e reprodutível. Desta maneira, pode ser verificado em que momento da digestão humana este se dissolve, como por exemplo, existem produtos que têm na sua forma um revestimento para que os ativos não se dissolvam no estômago. Assim, este ensaio serve para validar e comprovar a eficácia do revestimento aplicado.

Para o método analítico da dissolução, inicialmente, é necessário saber quais as condições de dissolução do produto em análise. Um aparelho de dissolução é constituído por copos de dissolução, um banho onde estão mergulhados os copos, um motor ligado a um dispositivo regulador de velocidade, uma haste giratória de aço inoxidável onde são, geralmente, usadas cestas ou pás que ficam submersas no meio de dissolução e agitam a mistura de maneira a dissolver a amostra estudada.

Este método é utilizado para medir a quantidade de substância ativa que é liberta no meio de dissolução, respeitando as condições de dissolução do protocolo de análise: pás ou cestos, temperatura do banho, quantidade e composição do meio de dissolução, tempo de dissolução e velocidade de agitação. Por ensaio é necessário estudar um número, previamente definido de amostras (comprimidos, cápsulas, supositórios), de modo a garantir a precisão do mesmo (Davidson, 2004).

1.5.1.3. Substâncias Aparentadas

No método de substâncias aparentadas pretende-se quantificar impurezas da substância ativa presentes na amostra. As substâncias aparentadas podem ter diferentes origens:

- De síntese, quando se trata de impurezas que estão na origem da substância ativa e que podem aparecer na sua análise em baixas concentrações;
- Ou de degradação da substância ativa durante o seu processo de fabrico e estabilidade.

Os testes de stress são utilizados para determinar a reação da substância ativa perante algumas adversidades, tais como a interação com um ácido, uma base ou quando expostas ao calor ou à luz (Lee & Zhang, 2004).

1.5.1.4. Parâmetros de desempenho analíticos

As características a serem consideradas na validação de métodos analíticos são investigadas tendo em conta diversos parâmetros de desempenho dos produtos, entre eles a especificidade, a linearidade, a exatidão, a precisão (repetibilidade do sistema, precisão intermédia), a robustez e a estabilidade das soluções. Estes parâmetros encontram-se descritos na *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements* (ICH) (ICH, 2005) e são escolhidos de acordo com o método analítico.

Especificidade

A especificidade é a capacidade do método analítico em detetar o analito (ou mais do que um) de interesse na presença de outros componentes da matriz (Chasin et al., 1998; ICH, 2005). É utilizado para qualificar um ou mais compostos específico independente da matriz da amostra e das suas impurezas.

Para as substâncias aparentadas é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes. Isto deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos em amostras contendo o ativo, comparativamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contém o ativo, incluindo estruturas semelhantes (Chasin et al., 1998).

Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada gama de concentrações e pode ser determinada a partir da relação matemática entre a concentração da substância ativa em solução e o sinal do pico de substância em estudo dada pelo sistema cromatográfico (Ribani et. al, 2004). Geralmente, é obtida por uma equação da reta:

$$\text{➤ } y = ax + b \text{ que é a curva de calibração.}$$

Usando o método matemático da regressão linear é possível estimar os coeficientes **a** (declive) e **b** (Y-interseção). Além destes, calcula-se o coeficiente de correlação **r** e o coeficiente de determinação **r²**, que são parâmetros que permitem uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximos de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. É recomendado pela Farmacopeia Europeia um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,995.

A relação linear descrita pela equação $y = ax + b$ só é válida num determinado intervalo de massa ou concentração da espécie medida (Ribani et al., 2004). A perda de linearidade é característica de cada técnica, ou seja, o cálculo dos coeficientes de regressão de uma curva analítica deve ser acompanhado de uma cuidadosa inspeção, para verificar se todos os pontos a serem usados estão dentro da gama de linearidade correspondente (Ribani et. al, 2004).

De modo a validar a linearidade são realizados outros testes estatísticos.

Para o cálculo do teste de correlação de Fisher ($F_{\text{calculado}} = SI^2/SR^2$), é necessário saber a variação total (T), a variação ao longo da regressão (I) e a variação residual (R), para haver correlação entre os valores de concentração das amostras usados e os sinais obtidos e assim o método ser linear, $F_{\text{calculado}}$ deve ser maior o igual ao F_{tabelado} :

$$I = b^2 \times \sum_{j=1}^k \left[\sum_{i=1}^n (x_{ij} - x_M)^2 \right]$$

Equação 1.2 Variação ao longo da regressão

Em que:

x_{ij} – concentração do padrão ij (mg/mL)

x_M – concentração média (mg/mL)

$$SI^2 = I$$

Equação 1.3 Variância ao longo da regressão

$$T = \sum_{j=1}^k \left[\sum_{i=1}^n (y_{ij} - y_M)^2 \right]$$

Equação 1.4 Variação Total

Em que:

y_{ij} – área de pico (mAU.s)

y_M – área média (mAU.s)

$$R = T - I$$

Equação 1.5 Variação Residual

$$SR^2 = \frac{R}{T - 2}$$

Equação 1.6 Variância Residual

$$F_{\text{calculado}} = \frac{SI^2}{SR^2}$$

Equação 1.7 Teste de correlação de Fisher

A compatibilidade do Y-interseção com o valor 0, é avaliada com o teste *t student*, em que o valor de *t* é calculado deve ser inferior ao *t* tabelado, sendo calculado por:

$$t = \frac{|a|}{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - (a + b \times x_i))^2}{N - 2}} \times \left(\frac{1}{N} + \frac{x_m^2}{\sum_{i=1}^N (x_i + x_m)^2} \right)}$$

Equação 1.8 Teste t student de linearidade

Em que:

N - nº de repetições

x_i – concentração do padrão (mg/mL)

y_i – área do pico (mAU.s)

x_m – média da calibração (mg/mL)

x_{ij} – concentração do padrão *ij* (mg/mL)

Exatidão

A exatidão de um método analítico traduz a proximidade do valor obtido experimentalmente ao valor teórico. Este é validado no intervalo de concentrações estipulado na gama do trabalho. Um método diz-se exato se o erro sistemático (módulo do erro absoluto) for inferior ao intervalo de confiança estimado.

Este parâmetro é analisado após a especificidade e ter sido estabelecido um intervalo de linearidade.

A análise é feita, com a preparação de uma ou três amostras de cada de três concentrações de padrão conhecidas diferentes, baixa, média e alta, sendo estas injetadas três vezes cada.

Após a análise é calculada a percentagem de recuperação do ativo, a partir da concentração conhecida de analito presente na amostra, da área de ativo dada pelo sistema cromatográfico e com base na calibração da gama da linearidade, daí ser a exatidão ao longo da linearidade (Pereira, 2008).

Para garantir a fiabilidade do método são estabelecidos limites para a percentagem de recuperação em torno da concentração de analito a 100% como critério de aceitação.

A compatibilidade do declive com o valor 1, é avaliado com o teste *t student*, em que o valor de **t** é calculado por:

$$t = |b - 1| \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i + x_m)^2}{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - (a + b \times x_i))^2}{N - 2}}}$$

Equação 1.9 Teste *t student* de exatidão

Se **t** for inferior a **t** (N-2) da tabela no nível de confiança, a inclinação pode ser assumida para ter um valor de 1. Se não, a inclinação da linha de calibração não é igual a 1 e o método não é exato.

Precisão

A precisão é o parâmetro em que se testa a proximidade dos resultados obtidos, injetando várias amostras, preparadas de forma igual, de concentrações conhecidas (repetibilidade dos ensaios) ou uma só amostra injetada várias vezes (repetibilidade do sistema). Todas as medições são efetuadas com o mesmo procedimento, o mesmo analista, o mesmo equipamento, no menor intervalo de tempo possível. É também realizado o ensaio de precisão intermédia, em que as medições são efetuadas com o mesmo procedimento, no entanto são divididas em três grupos, nos quais se podem alterar um de três parâmetros: o dia do ensaio, o analista ou o equipamento utilizado.

A repetibilidade pode ser determinada por meio da análise de padrões, com concentrações conhecidas e pelo desvio padrão relativo (RSD) associado à média dos resultados obtidos. O limite de repetibilidade (**r**) é o valor máximo permitido para a diferença absoluta entre dois ensaios obtidos em condições de repetibilidade, calculada para o nível de confiança de 97,5 % (Pereira, 2008).

Em seguida estão as equações utilizadas para a precisão intermédia:

$$m_i = \frac{\sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij})}{n_i}$$

Equação 1.10 Média de cada grupo

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - m_i)^2}{n_i - 1}$$

Equação 1.11 Variância por grupo

Em que:

i - Grupo

$n_i - 1$ - Número de graus de liberdade

$$S_r^2 = \frac{\sum_{i=1}^p ((n_i - 1) \times S_i^2)}{(\sum_{i=1}^p (n_i)) - p}$$

Equação 1.12 Variância da repetibilidade

Em que:

i: Quantidade de grupos

$$S_g^2 = \frac{\frac{\sum_{i=1}^p (n_i \times (m_i - m_p)^2)}{p - 1} - S_r^2}{n_p}$$

Equação 1.13 Variância inter-grupo

$$m_p = \frac{\sum_{i=1}^p (n_i \times m_i)}{\sum_{i=1}^p (n_i)}$$

Equação 1.14 Média das médias dos grupos

$$SR^2 = S_r^2 + S_g^2$$

Equação 1.15 Média das médias dos grupos

$$CV_r = \frac{100 \times S_r}{m_p}$$

Equação 1.16 Coeficiente de variação de repetibilidade

$$CV_R = \frac{100 \times S_R}{m_p}$$

Equação 1.17 Coeficiente de variação da precisão intermédia

Limites de quantificação (LQ)

O LQ, corresponde à menor concentração medida a partir da qual é possível quantificar a substância ativa em estudo, com exatidão e precisão. Este é tirado da reta da linearidade ou pelo S/N de concentrações menores do que a mais baixa da gama de linearidade e desta inclusive. A concentração onde se obtiver o valor de $S/N \geq 10$ e RSD de áreas $\leq 3\%$ é o limite de quantificação. (Castro & Cabrita, 2000).

Robustez

A robustez de um método de ensaio é o parâmetro que verifica se este é sensível a pequenas alterações feitas, seja nas condições cromatográficas ou na preparação das amostras, que podem, por ventura, ocorrer na realização rotineira do método. Este é robusto quando se mostra praticamente insensível perante estas variações (Pereira, 2008). Quanto maior for a robustez de um método, maior é a confiança desse relacionamento à sua precisão.

Como exemplo de grupos de robustez existe a alteração do fluxo de fase móvel a passar no sistema cromatográfico, das proporções da fase móvel, da temperatura da coluna ou mesmo na preparação da amostra. Todos estes podem ser erros do analista ou mesmo do sistema.

Estabilidade

A estabilidade é o parâmetro que verifica por quanto tempo uma solução padrão ou amostra pode ser analisada sem perder as suas características e sem influenciar os resultados.

Uma solução é considerada estável até ao ponto em que os resultados diferem mais ou menos 2% da amostra ou padrão no tempo inicial. Assim que este valor é ultrapassado verifica-se que a solução é estável pelo menos até esse período.

1.6. Substâncias Ativas

1.6.1. Arteméter

O Arteméter tem como fórmula molecular $C_{16}H_{26}O_5$ e o seu peso molecular é de 298,4 g/mol, a sua estrutura está representada na figura 1.2. Este é um análogo sintético da Artemisinina, que costumava ser utilizada tradicionalmente pelos chineses contra a malária. É muito solúvel em diclorometano e acetona e solúvel em acetato de etilo e etanol desidratado. O Arteméter exibe maior atividade e é absorvido mais facilmente que outros derivados da Artemisinina, mas o seu mecanismo de ação pode envolver lesão da membrana do parasita por radicais livres ou alquilação covalente de proteínas (Maheshbhai, 2012).

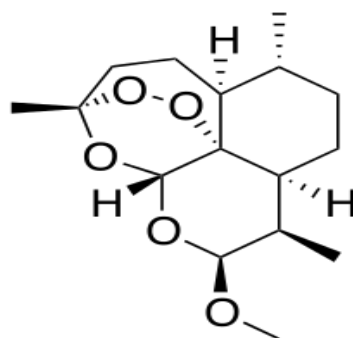


Figura 1.2. Estrutura do Arteméter (Maheshbhai, 2012)

1.6.2. Lumefantrina

A Lumefantrina tem como fórmula molecular $C_{30}H_{32}Cl_3NO$, a sua estrutura está representada na figura 1.3, outrora conhecida como Benflumetol, e foi originalmente sintetizada pela Academia de Ciências Médicas Militares em Pequim, na década de 1970. Foi registada na China para uso antimalárico em 1987. A Lumefantrina tem pouca solubilidade em água e óleos, é solúvel em dimetilformamida, acetato de etilo e diclorometano, e pouco solúvel em etanol e metanol (Maheshbhai, 2012).

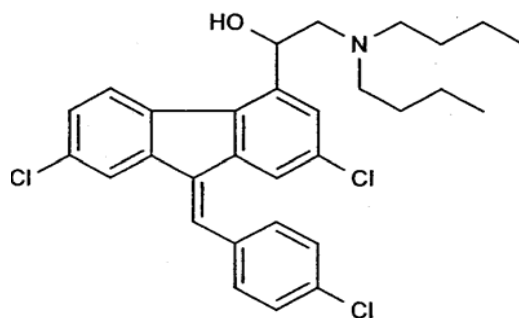


Figura 1.3. Estrutura da Lumefantrina (Maheshbhai, 2012)

2. MATERIAIS E MÉTODOS

De modo a verificar e controlar a qualidade de um produto farmacêutico, é necessário fazer vários ensaios. No caso estudado nesta dissertação, foram validados os métodos de doseamento e de dissolução dos compostos ativos, tendo ainda sido desenvolvido o método para substâncias aparentadas por HPLC. Para o produto analisado, apenas, o método de doseamento é comum aos dois ativos (Arteméter e Lumefantrina) presentes no mesmo, logo, os outros dois métodos são validados para cada um, individualmente, respeitando a *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements* (ICH) (ICH, 2005).

2.1. Doseamento (Descrição do Método no Anexo A)

O principal objetivo no ensaio de Doseamento é quantificar as substâncias ativas presentes na amostra. Para este ensaio é necessário um detetor de diferentes comprimentos de onda (DAD), de modo a quantificar e identificar de forma correta os picos de ambos os ativos.

2.1.1. Especificidade

Injetar uma solução de solvente, uma solução de placebo, uma solução de padrão de Arteméter, uma solução de padrão de Lumefantrina, uma solução padrão de trabalho e uma solução de matriz conforme a tabela 2.1:

Tabela 2.1. Composição das soluções

	Solvente (mg/mL)	Placebo (mg/mL)	Arteméter (mg/mL)	Lumefantrina (mg/mL)
Solução Solvente	+	-	-	-
Solução Placebo	+	0,535	-	-
Solução Padrão de Arteméter	+	-	0,1	-
Solução Padrão de Lumefantrina	+	-	-	0,6
Solução Padrão	+	-	0,1	0,6
Solução Matriz	+	0,535	0,1	0,6

Nota: as soluções foram preparadas consoante a preparação de soluções referida no anexo A.

2.1.2. Linearidade

Prepararam-se sete soluções padrão de concentração crescente de substâncias ativas, cerca de 80%, 85%, 95%, 100%, 105%, 115%, 120% do valor teórico, denominadas respectivamente por SI, SII, SIII, SIV, SV, SVI, SVII conforme descrito na tabela 2.2. Injetar cada solução padrão três vezes, aleatoriamente.

Tabela 2.2. Composição das Soluções de Arteméter e de Lumefantrina - Doseamento

Soluções de Arteméter e Lumefantrina	SI	SII	SIII	SIV	SV	SVI	SVII
Teor em substância ativa (%)	80	85	95	100	105	115	120
Teor em Arteméter (mg/mL)	0.080	0.085	0.095	0.10	0.105	0.115	0.120
Teor em Lumefantrina (mg/mL)	0.48	0.51	0.57	0.60	0.63	0.69	0.72

2.1.3. Exatidão sobre o intervalo da linearidade

Prepararam-se três amostras de uma matriz com concentrações nos pontos extremos da gama de linearidade, 80%, 100% e 120%, do valor teórico da substância ativa, como mostra a tabela 2.3. Injetaram-se as soluções em triplicado e sequencialmente.

Tabela 2.3. Composição das soluções da exatidão - Doseamento

Componente	Matriz a 80%	Matriz a 100%	Matriz a 120%
Concentração de Arteméter (mg/mL)	0.080	0.100	0.115
Concentração de Lumefantrina (mg/mL)	0.480	0.600	0.720
Concentração de Placebo (mg/mL)	0.675	0.535	0.400

2.1.4. Precisão do Sistema

A precisão do sistema foi determinada através de seis injeções consecutivas da mesma solução padrão, de modo a poder verificar-se se o sistema cromatográfico é viável neste método analítico.

2.1.5. Precisão

O estudo da precisão foi efetuado através da elaboração de três grupos segundo as diferenças descritas na tabela 2.4. Em cada grupo, foi preparada uma solução padrão a 100%, posteriormente injetada seis vezes, e uma matriz a 100%, que foi injetada seis vezes.

Tabela 2.4. Sequência de trabalho da precisão

	Dia de Trabalho	Operador	Equipamento
Grupo 1	1º	Operador 1	1
Grupo 2	2º	Operador 2	1
Grupo 3	3º	Operador 1	2

2.1.6. Robustez

No ensaio da Robustez, apresentaram-se duas soluções. Entre elas apenas foi alterada a preparação do solvente A, dando origem a nove grupos de robustez, alterando-se a temperatura da coluna, o pH do tampão, as proporções da fase móvel e o fluxo da fase móvel no sistema cromatográfico.

2.1.7. Estabilidade

Foram preparadas soluções amostra e padrão da maneira descrita no método de análise e colocadas em *vials* necessários para o estudo do teste de estabilidade. Para cada “tempo” testado, injetaram-se seis injeções de padrão e três injeções de amostra, uma de cada *vial*, e uma injeção de solução padrão de verificação. O “tempo - 0 horas” foi determinado 1 hora após a preparação das soluções.

A estabilidade das soluções foi testada nos seguintes tempos aproximados:

- 0 horas com temperatura ambiente no amostrador
- 10 horas com temperatura ambiente no amostrador
- 20 horas com temperatura ambiente no amostrador
- 30 horas com temperatura ambiente no amostrador

2.2. Dissolução

O objetivo principal do método da dissolução é garantir que os ativos presentes no comprimido dissolvem nas condições indicadas no método de análise. Neste caso, a análise de cada ativo foi feita individualmente, dado que cada um tem as suas condições de dissolução e cromatográficas.

2.2.1. Dissolução Arteméter (Descrição do Método no Anexo B)

2.2.1.1. Especificidade

Injetou-se uma solução de solvente (meio de dissolução), uma solução de placebo, uma solução de padrão e uma solução de matriz, conforme o esquema da tabela 2.5. Para preparar as soluções, utilizou-se o equipamento de dissolução.

Tabela 2.5. Composição das soluções

Solução	Meio de Dissolução (mL)	Placebo (mg)	Padrão de Lumefantrina (mg)	Padrão de Arteméter (mg)	Comprimido (un)
Solução solvente	1000	—	—	—	-
Solução Placebo	1000	107.0	120.0	—	-
Solução padrão a 100% de Arteméter	1000	—	—	20.0	-
Solução matriz preparada laboratorialmente	1000	107.0	120.0	20.0	-
Solução matriz com comprimido	1000	-	-	-	1

2.2.1.2. Linearidade

Prepararam-se sete soluções padrão de concentração crescente de Arteméter, cerca de 20%, 40%, 60%, 80%, 90%, 100%, 110% do valor teórico, denominadas respetivamente por SI, SII, SIII, SIV, SV, SVI, SVII conforme descrito na tabela 2.6. Cada solução padrão foi injetada três vezes, aleatoriamente.

Tabela 2.6. Composição das Soluções de Arteméter – Dissolução

Soluções de Arteméter	SI	SII	SIII	SIV	SV	SVI	SVII
Teor em substância ativa (%)	20	40	60	80	90	100	110
Teor em Arteméter (mg/mL)	0.008	0.010	0.012	0.016	0.018	0.020	0.022

2.2.1.3. Exatidão sobre o intervalo da linearidade

Prepararam-se três amostras de uma matriz com concentrações aproximadas a 60%, 80% e 100% do valor teórico da substância ativa, seguindo a literatura o valor central é 80%. Para preparar a matriz, foram utilizados os dados da tabela 2.7 e o equipamento de dissolução.

Tabela 2.7. Composição das soluções da exatidão de Arteméter – Dissolução

Componente	Matriz a 60%	Matriz a 80%	Matriz a 100%
Meio de Dissolução (mL)	1000	1000	1000
Concentração de Arteméter (mg/mL)	0.012	0.016	0.020
Concentração de Lumefantrina (mg/mL)	0.120	0.120	0.120
Concentração de Placebo (mg/mL)	0.115	0.111	0.111

2.2.2. Precisão do Sistema

A precisão do sistema foi determinada através de seis injeções consecutivas da mesma solução padrão, de modo a poder verificar-se a se o sistema cromatográfico é viável neste método analítico.

2.2.2.1. Precisão

O estudo da precisão foi efetuado através da elaboração de três grupos, de acordo com as diferenças descritas na tabela 2.8. Em cada grupo foi preparada uma solução padrão a 100%, que foi injetada seis vezes.

Tabela 2.8. Sequência de trabalho da precisão

	Dia de Trabalho	Operador	Equipamento
Grupo 1	1º	Operador 1	1
Grupo 2	1º	Operador 2	2
Grupo 3	2º	Operador 1	1

2.2.2.2. Robustez

Para a robustez do método de dissolução, prepararam-se três amostras como descrito anteriormente no ensaio da precisão. Foram, posteriormente, realizados dez grupos de trabalho, onde em cada um foi injetado seis vezes o padrão e injetado uma vez em cada amostra por grupo. Em cada um destes grupos foi alterada, à vez, uma das condições cromatográficas, de preparação dos padrões e amostras aplicadas ao método da dissolução (temperatura da coluna, fluxo, composição da fase móvel e filtros usados).

2.2.2.3. Estabilidade

Foram preparadas soluções amostra e padrão da maneira descrita no método de análise e colocadas em *vials* necessários para o estudo do teste de estabilidade. Para cada “tempo” testado injetaram-se seis injeções de padrão e três injeções de amostra, uma de cada *vial* e uma injeção de solução padrão de verificação. O “tempo - 0 horas” foi determinado 1 hora após a preparação das soluções.

A estabilidade das soluções foi testada nos seguintes tempos aproximados:

- 0 horas com temperatura ambiente no amostrador
- 10 horas com temperatura ambiente no amostrador
- 20 horas com temperatura ambiente no amostrador
- 30 horas com temperatura ambiente no amostrador

2.2.3. Dissolução Lumefantrina (Descrição do Método no Anexo C)

2.2.3.1. Especificidade

Injetou-se uma solução de solvente, uma solução de placebo, uma solução de padrão e uma solução de matriz, como está representado na tabela 2.9. Para preparar as soluções, utilizou-se o equipamento de dissolução.

Tabela 2.9. Composição das soluções

Solução	Meio de Dissolução (mL)	Placebo (mg)	Padrão de Arteméter (mg)	Padrão de Lumefantrina (mg)	Comprimido (un)
Solução solvente	1000	–	–	–	-
Solução Placebo	1000	107.0	20.0	–	-
Solução padrão a 100% de Lumefantrina	1000	–	–	120.0	-
Solução matriz preparada laboratorialmente	1000	107.0	20.0	120.0	-
Solução matriz com comprimido	1000	-	-	-	1

2.2.3.2. Linearidade

Prepararam-se sete soluções padrão de concentração crescente de substâncias ativas, cerca de 20%, 40%, 60%, 80%, 90%, 100%, 110% do valor teórico, denominadas respectivamente por SI, SII, SIII, SIV, SV, SVI, SVII conforme descrito na tabela 2.10.

Cada solução padrão foi injetada três vezes, aleatoriamente.

Tabela 2.10. Composição das Soluções de Lumefantrina - Dissolução

Soluções Lumefantrina	SI	SII	SIII	SIV	SV	SVI	SVII
Teor em substância activa (%)	20	40	60	80	90	100	110
Teor em Lumefantrina (mg/mL)	0.024	0.048	0.072	0.096	0.108	0.120	0.132

2.2.3.3. Exatidão sobre o intervalo da linearidade

Prepararam-se três amostras de uma matriz com concentrações aproximadas a 60%, 80% e 100% do valor teórico da substância ativa, devido ao valor central de dissolução ser 80%. Para preparar a matriz, utilizaram-se os dados da tabela 2.11 e o equipamento de dissolução.

Colocou-se 1000mL de meio de dissolução em 3 copos. Quando a temperatura atingiu os 37°C +/- 0.5°C, puseram-se as quantidades de padrão de Arteméter, Lumefantrina e placebo indicadas no quadro abaixo. Colocou-se o equipamento em funcionamento nas condições descritas e passados 45 minutos retirou-se uma parte da solução e filtrou-se com filtro PVDF 0.45µm.

Estas soluções foram lidas em triplicado, sequencialmente, estão na tabela abaixo.

Tabela 2.11. Composição das soluções da exatidão de Lumefantrina – Dissolução

Componente	Matriz a 60%	Matriz a 80%	Matriz a 100%
Meio de Dissolução (mL)	1000	1000	1000
Concentração de Lumefantrina (mg/mL)	0.072	0.096	0.120
Concentração de Arteméter (mg/mL)	0.020	0.020	0.020
Concentração de Placebo (mg/mL)	0.155	0.131	0.107

2.2.3.4. Precisão do Sistema

A precisão do sistema foi determinada através de seis injeções consecutivas da solução padrão.

2.2.3.5. Precisão

O estudo da precisão foi efetuado através da elaboração de três grupos, segundo as diferenças descritas na tabela 2.12. Para cada grupo foi preparada uma solução padrão a 100%, que foi injetada seis vezes.

Tabela 2.12. Sequência de trabalho da precisão

	Dia de Trabalho	Operador	Equipamento
Grupo 1	1º	Operador 1	1
Grupo 2	1º	Operador 2	2
Grupo 3	2º	Operador 1	1

2.2.3.6. Robustez

Para a robustez do método de dissolução foram preparadas três amostras como descrito anteriormente no ensaio da precisão. Foram então, posteriormente, realizados dez grupos de trabalho, tendo sido injetado seis vezes em cada um o padrão e uma vez em cada amostra por grupo. Em cada um destes grupos foi alterada, à vez, uma das condições cromatográficas, de preparação dos padrões e amostras aplicadas ao método da dissolução (temperatura da coluna, fluxo, composição da fase móvel e filtros usados).

2.2.3.7. Estabilidade

Foram preparadas soluções amostra e padrão da maneira descrita no método de análise e colocadas em *vials* necessários para o estudo do teste de estabilidade. Para cada “tempo” testado, injetaram-se seis injeções de padrão e três injeções de amostra, uma de cada *vial* e uma injeção de solução padrão de verificação. O “tempo - 0 horas” foi determinado 1 hora após a preparação das soluções.

A estabilidade das soluções foi testada nos seguintes tempos aproximados:

- 0 horas com temperatura ambiente no amostrador
- 10 horas com temperatura ambiente no amostrador
- 20 horas com temperatura ambiente no amostrador
- 30 horas com temperatura ambiente no amostrador

2.3. Substâncias Aparentadas

O ensaio das substâncias aparentadas foi desenvolvido com base nas normas de análise de matéria-prima correspondente a cada ativo, de modo a haver uma análise cromatográfica por HPLC, pois na norma de análise do medicamento a ser validado, o método das substâncias aparentadas é feito por cromatografia de camada fina. Com este método analítico alterado espera-se obter uma maior facilidade na pesquisa de impurezas e melhor detecção e quantificação das mesmas.

Devido à dificuldade em adquirir as quantidades necessárias de impurezas conhecidas para a validação do método das substâncias aparentadas, foi usada substância ativa nas concentrações descritas no método analítico.

2.3.1. Substâncias Aparentadas de Arteméter (Descrição do Método no Anexo D)

2.3.1.1. Especificidade

Injetou-se uma solução de solvente, uma solução de placebo, uma solução de padrão de Arteméter, de Dihidroartemesinina e alfa-arteméter e uma solução de matriz, conforme a tabela 2.13.

Tabela 2.13. Composição das soluções – Substâncias Aparentadas

Solução	Placebo (mg/mL)	Lumefantrina (mg/mL)	Arteméter (mg/mL)	Dihidroartemesinina (mg/mL)	α -Arteméter (mg/mL)	Comprimidos (un)
Solução solvente	-	-	-	-	-	-
Solução Placebo	0.268	0.300	-	-	-	-
Solução padrão de Arteméter	-	-	0.050			-
Solução padrão de Dihidroartemesinina				0.5		
Solução padrão de α -Arteméter					0.5	
Solução SST			10	0.01	0.015	-
Solução Amostra	-	-	-			10

2.3.1.2. Testes de *Stress*

Os testes de *stress* são executados com a intenção de expor a amostra a condições extremas. A amostra é colocada em meio ácido e alcalino, é oxidada com peróxido de Hidrogénio (H_2O_2), é exposta a radiação ultravioleta e é sujeita a degradação térmica de modo a ser degradada, com o objetivo de avaliar as possíveis degradações que possam aparecer na amostra em estudo.

Esta avaliação foi efetuada pelo método HPLC das substâncias aparentadas para Arteméter com base nas normas de análise da matéria-prima, de modo a verificar as degradações nas diferentes condições de stress em estudo.

2.3.1.3. Linearidade

Prepararam-se sete soluções padrão de concentração crescente de substâncias ativas, cerca de 0,05 %, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,5%, 1,0%, 1,5% do valor teórico, denominadas respetivamente por SI, SII, SIII, SIV, SV, SVI, SVII, conforme descrito na tabela 2.14.

Cada solução padrão foi injetada três vezes, aleatoriamente.

Tabela 2.14. Composição de soluções de Arteméter

Soluções de Arteméter	SI	SII	SIII	SIV	SV	SVI	SVII
Teor em substância activa (%)	0,05	0,10	0,20	0,30	0,50	1,00	1,50
Teor em Arteméter (mg/mL)	0,005	0,010	0,020	0,030	0,050	0,100	0,150

2.3.1.4. Exatidão sobre o intervalo da linearidade

Prepararam-se três amostras de uma matriz com concentrações aproximadas a 0,2%, 0,3% e 1,5% do valor teórico da substância ativa, porque a concentração limite de impurezas é 0,3%.

Estas soluções foram lidas em triplicado, sequencialmente, e a suas composições estão descritas na tabela 2.15.

Tabela 2.15. Composição das matrizes da exatidão de Arteméter – Substâncias Aparentadas

Componente	Matriz a 0,2%	Matriz a 0,3%	Matriz a 1,5%
Concentração de Arteméter (mg/mL)	0,020	0,030	0,15
Concentração de Lumefantrina (mg/mL)	0,120	0,180	0,900
Concentração de Placebo (mg/mL)	0,110	0,160	0,830

2.3.1.5. Precisão do Sistema

A precisão do sistema foi determinada através de seis injeções consecutivas da solução padrão.

2.3.1.6. Precisão

O estudo da precisão foi efetuado através da elaboração de três grupos, com as diferenças descritas na tabela 2.16. Em cada grupo foi preparada uma solução padrão a 100%, que foi injetada seis vezes.

Para cada grupo fez-se uma solução amostra na mesma concentração que foi injetada seis vezes no sistema cromatográfico.

Tabela 2.16. Sequência de trabalho da precisão

	Dia de Trabalho	Operador	Equipamento
Grupo 1	1º	Operador 1	1
Grupo 2	2º	Operador 2	2
Grupo 3	2º	Operador 1	1

2.3.1.7. Limite de Quantificação

O limite de quantificação foi determinado pelo estudo da linearidade e pela análise da repetibilidade do sistema de uma solução com concentração conhecida de 0,05%, mas devido ao ruído não foi possível quantificar o ativo. Por isso repetiu-se o teste com a concentração 0,1%.

2.3.1.8. Robustez

Para a robustez do método das Substâncias Aparentadas, foram preparadas três amostras como descrito anteriormente no ensaio da precisão. Posteriormente, foram realizados quatro grupos de trabalho, onde em cada um foi injetado seis vezes o padrão e uma vez cada amostra por grupo. Em cada um destes grupos foi alterada, à vez, uma das condições cromatográficas, de preparação dos padrões e amostras aplicadas ao método das Substâncias Aparentadas (fluxo e composição da fase móvel).

2.3.2. Substâncias Aparentadas de Lumefantrina (Descrição do Método no Anexo E)

2.3.2.1. Especificidade

Injetou-se uma solução de solvente, uma solução de placebo, uma solução de padrão de Lumefantrina e uma solução de matriz conforme a tabela 2.17.

Tabela 2.17 – Composição das soluções – substâncias aparentadas

Solução	Placebo (mg/mL)	Arteméter (mg/mL)	Lumefantrina (mg/mL)	Epóxido (mg/mL)	DDFE (mg/mL)	Comprimidos (un.)
Solução solvente	-	-	-	-	-	-
Solução Placebo	0.90	0.17	-	-	-	-
Solução padrão de Lumefantrina	-	-	1.00			-
Solução padrão de Epóxido				0.10		
Solução padrão de DDFE					0.10	
Solução SST			0.50	0.0005	0.0005	-
Solução Amostra	-	-	-			1

2.3.2.2. Testes de Stress

Os testes de *stress* são executados com a intenção de expor a amostra a condições extremas. A amostra é colocada em meio ácido e alcalino, é oxidada com peróxido de Hidrogénio (H₂O₂), é exposta a radiação ultravioleta e é sujeita a degradação térmica de modo a ser degradada, com o objetivo de avaliar as possíveis degradações que possam aparecer na amostra em estudo.

Esta avaliação foi efetuada pelo método HPLC das substâncias aparentadas para Lumefantrina com base nas normas de análise da matéria-prima, de modo a verificar as degradações nas diferentes condições de *stress* em estudo.

3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

3.1. Doseamento

3.1.1. Especificidade

3.1.1.1. Critérios de aceitação

A presença de picos no solvente ou fase móvel e outros compostos do placebo não deve interferir com os picos de interesse.

3.1.1.2. Resultados

Em seguida estão os cromatogramas com os dois comprimentos de onda onde se distinguem melhor os picos de ativo (380nm em cima, 210nm em baixo), representados da figura 3.1 à 3.6.

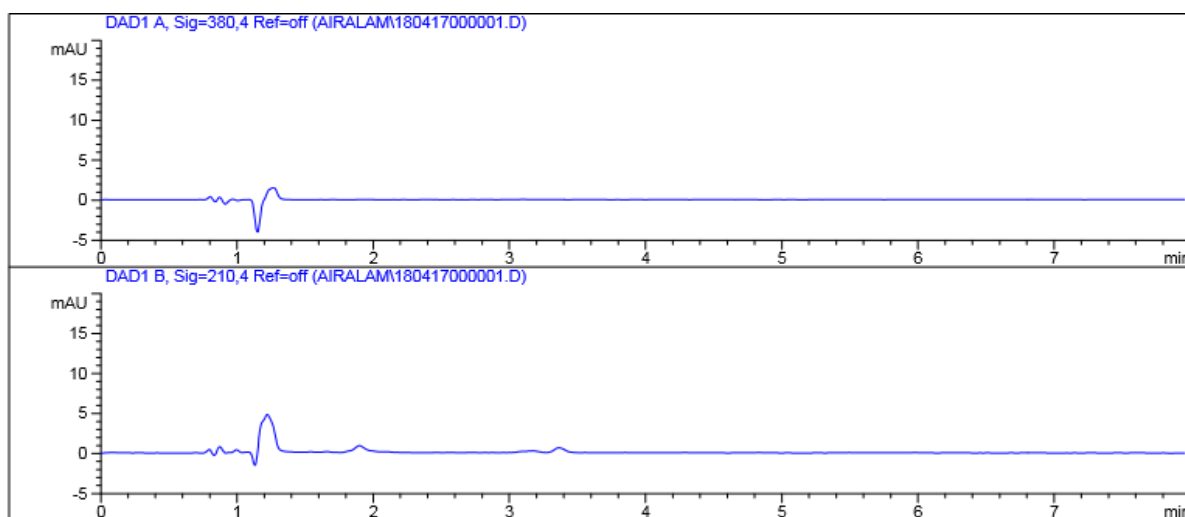


Figura 3.1. Cromatograma solvente. Em cima: 380 nm; em baixo: 210 nm

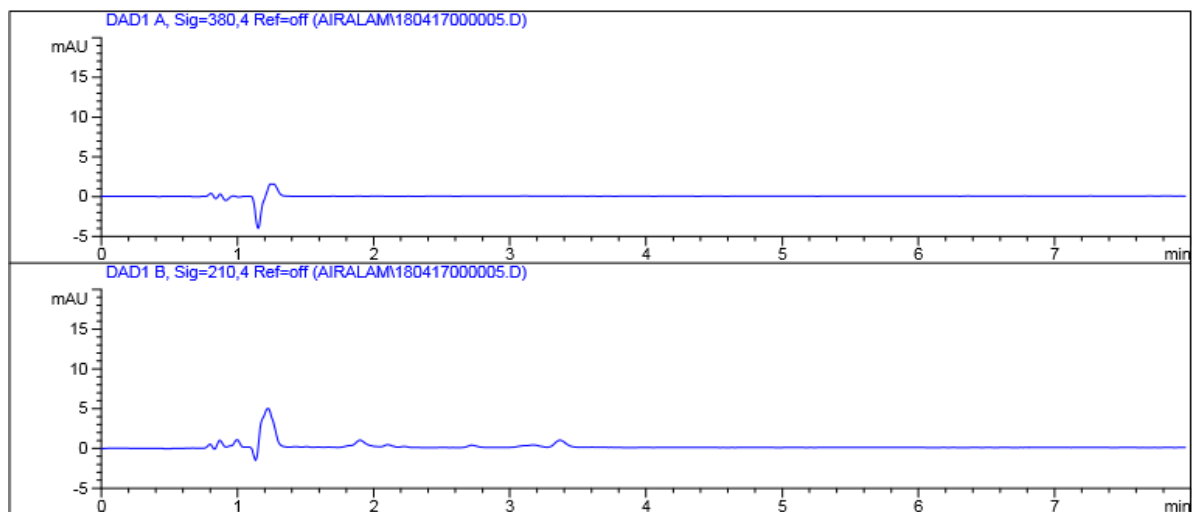


Figura 3.2. Cromatograma placebo. Em cima: 380 nm; em baixo: 210 nm

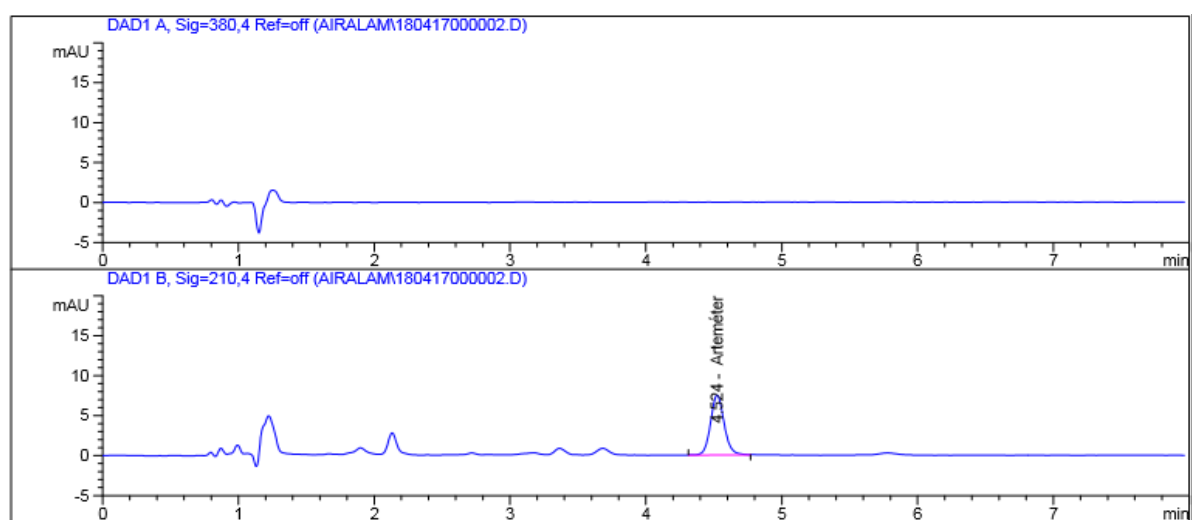


Figura 3.3. Cromatograma padrão de Arteméter. Em cima: 380 nm; em baixo: 210 nm

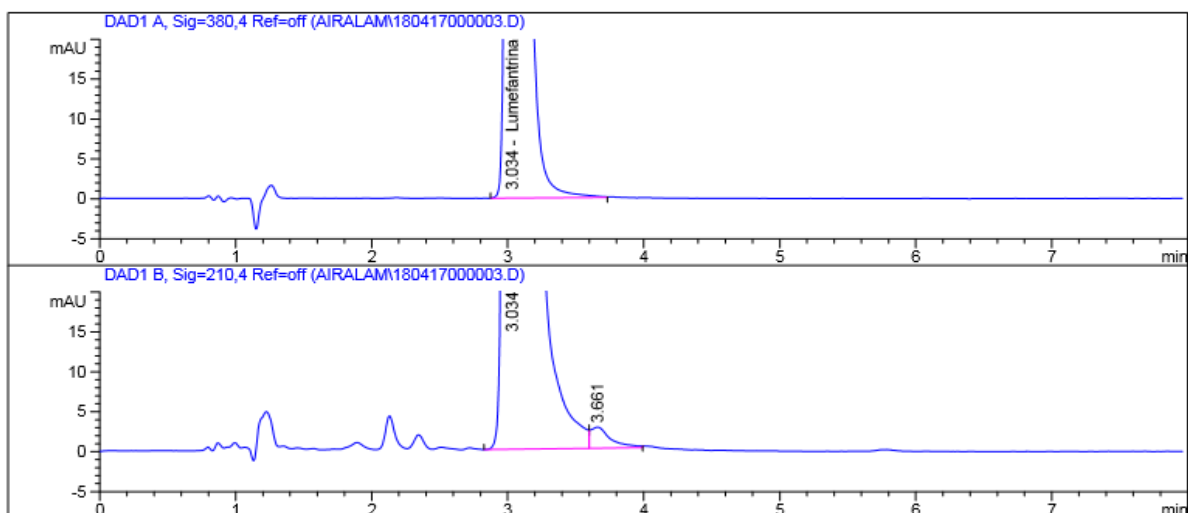


Figura 3.4. Cromatograma padrão de Lumefantrina. Em cima: 380 nm; em baixo: 210 nm

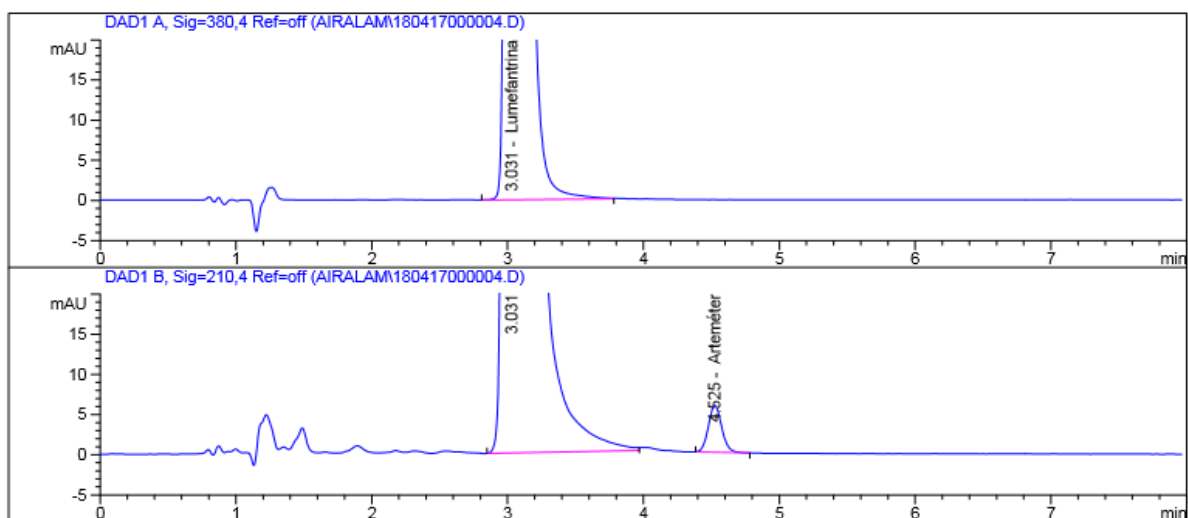


Figura 3.5. Cromatograma padrão de trabalho. Em cima: 380 nm; em baixo: 210 nm

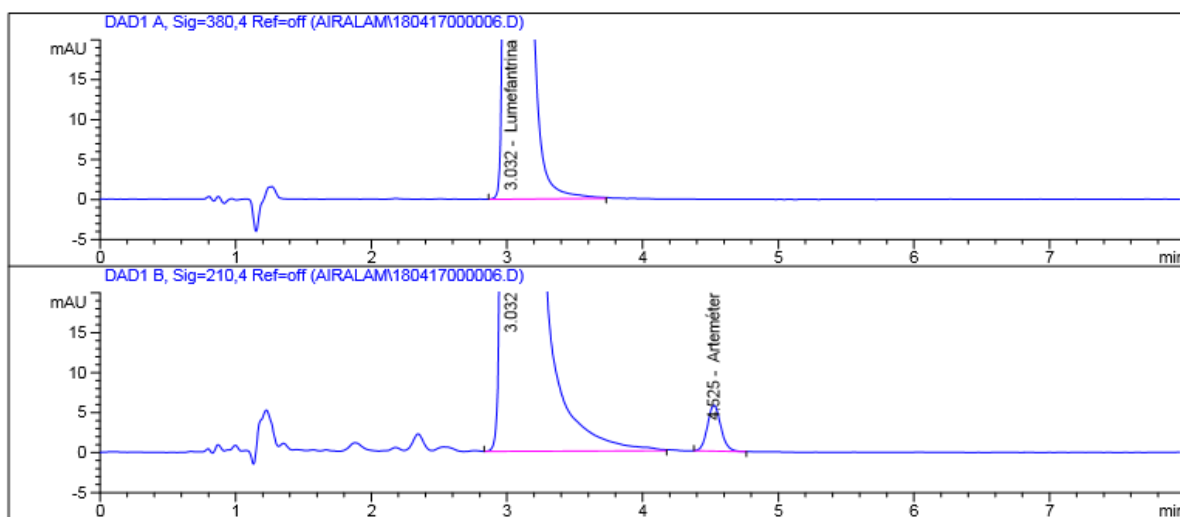


Figura 3.6. Cromatograma matriz. Em cima: 380 nm; em baixo: 210 nm

3.1.1.3. Conclusão

Concluiu-se que os picos de solvente, fase móvel e placebo não interferem na análise dos picos dos ativos, cumprindo os critérios de aceitação. No comprimento de onda mais elevado (380nm), o pico de Arteméter não é detetado, ao contrário do pico de Lumefantrina que é detetado em ambos os comprimentos de onda, sendo apenas quantificado no maior comprimento de onda, devido à interferência de compostos no mais baixo. Isto acontece porque cada ativo tem um comprimento de onda de ótima absorção, ou seja, tem um comprimento de onda onde é detetado e lido mais facilmente. Os comprimentos de onda onde estes ativos devem ser lidos estão descritos na lista *Drug Master Files*.

3.1.2. Linearidade

3.1.2.1. Critérios de aceitação:

- O coeficiente de correlação, $r \geq 0.995$
- Correlação entre a concentração do ativo e os sinais obtido ($F_{\text{calculado}} \geq F_{\text{tabelado}}$)
- Compatibilidade do valor de Y- interceção com o valor 0 ($t_{\text{calculado}} \leq t_{\text{tabelado}}$)

3.1.2.2. Resultados Arteméter

Com auxílio do *software VALIDATION MANAGER 3*, trataram-se os dados apresentados nas tabelas 3.1 para arteméter e 3.4 para lumefantrina, individualmente por ativo, utilizando diferentes testes estatísticos.

Tabela 3.1. Concentração das soluções e Áreas obtidas da Linearidade de Arteméter - Doseamento

Concentração (mg/mL)	Área (mAU.s)
0,080	30,096
	32,131
	32,097
0,085	33,764
	33,900
	34,042
0,095	38,061
	37,848
	37,905
0,100	40,027
	40,005
	40,240
0,105	41,816
	42,215
	41,670
0,110	43,496
	43,907
	43,907
0,116	46,255
	46,356
	46,590

De acordo com a equação da reta da linearidade $y=mx+b$ obtiveram-se os gráficos apresentados nas figuras 3.7 e 3.8 e os testes estatísticos nas tabelas 3.2 e 3.3.

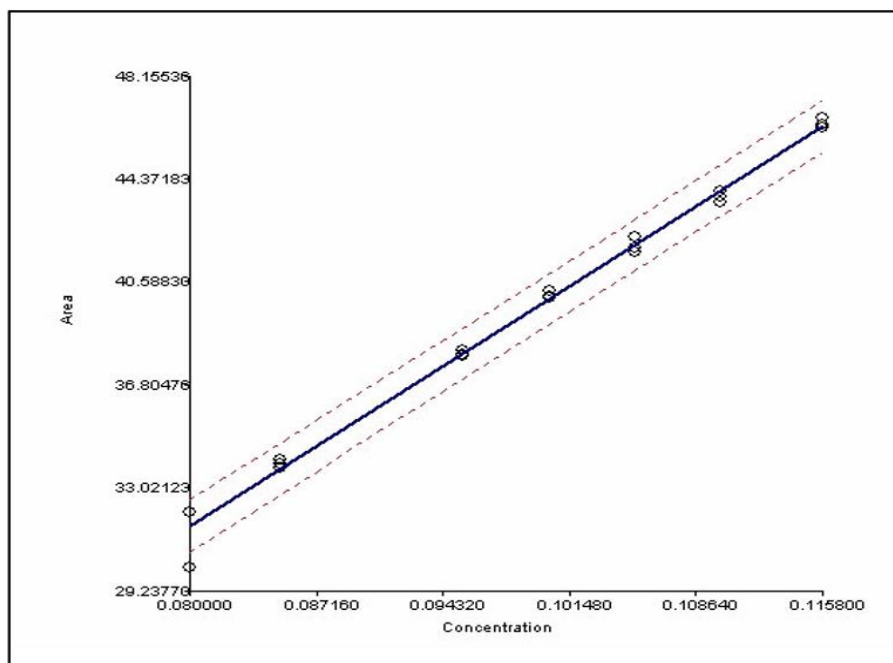


Figura 3.7. Curva de calibração da linearidade de Arteméter – Doseamento

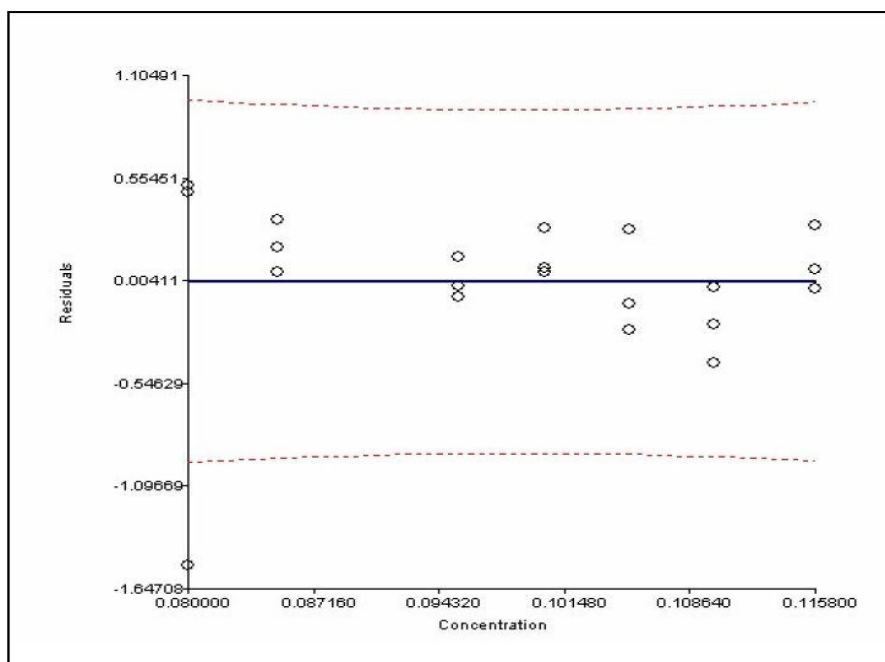


Figura 3.8. Distribuição de resíduos da linearidade de Arteméter – Doseamento

Tabela 3.2. Análise de variância da Linearidade de Arteméter - Doseamento

Nível de Confiança	97,50
<i>t Student</i>	2,093
Y interceção	-1,17
Declive	409,83
Coeficiente de correlação (<i>r</i>)	0,997
Coeficiente de determinação (<i>r</i> ²)	0,993
Variância consoante a regressão (<i>SI</i> ²)	509,41
Variância residual (<i>SR</i> ²)	0,19
Somatório dos quadrados residual	3,58

Tabela 3.3. Testes estatísticos da linearidade de Arteméter - Doseamento

Teste de Correlação de Fisher	
Nível de confiança	97,50
Graus de Liberdade (1, 2)	1, 19
<i>F</i> tabelado	8,070
<i>F</i> calculado	2706,474
Compatibilidade entre Y interceção e o valor 0	
Nível de confiança	97,50
Graus de Liberdade	19
<i>t</i> tabelado	2,093
<i>t</i> calculado	1,490

3.1.2.3. Resultados Lumefantrina

Tabela 3.4. Concentração das soluções e Áreas obtidas da Linearidade de Lumefantrina - Doseamento

Linearidade	
Concentração (mg/mL)	Área (mAU.s)
0,481	1960,712
	1986,020
	1986,066
0,512	2090,722
	2088,414
	2089,757
0,574	2346,105
	2344,990
	2341,678
0,602	2451,605
	2477,673
	2493,127
0,630	2563,841
	2565,292
	2565,183
0,700	2849,521
	2850,322
	2848,887
0,723	2961,419
	2961,510
	2981,149

De acordo com a equação da reta da linearidade $y=mx+b$ obtiveram-se os gráficos apresentados nas figuras 3.9 e 3.10 e os testes estatísticos nas tabelas 3.5 e 3.6.

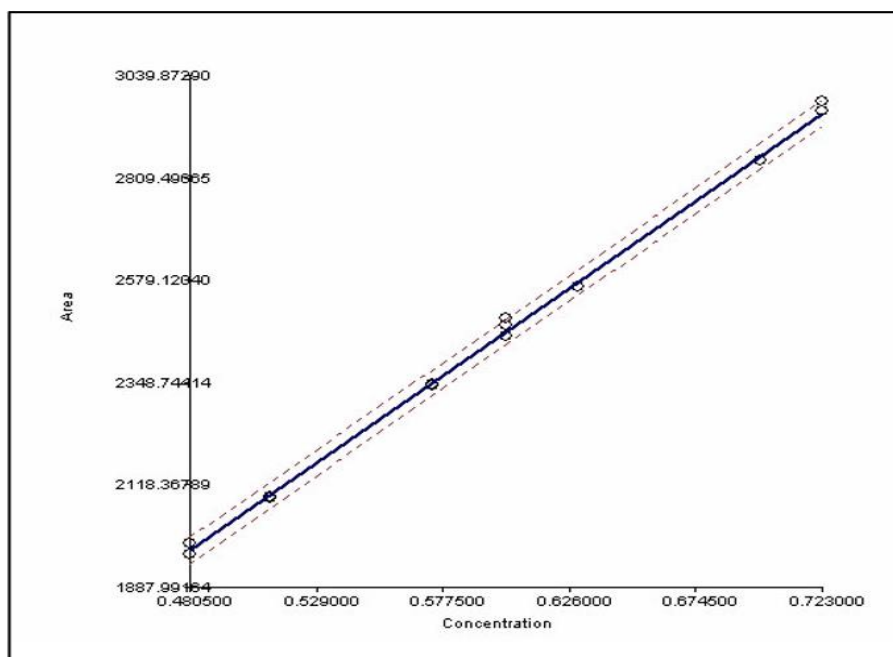


Figura 3.9. Curva de calibração da linearidade da Lumefantrina - Doseamento

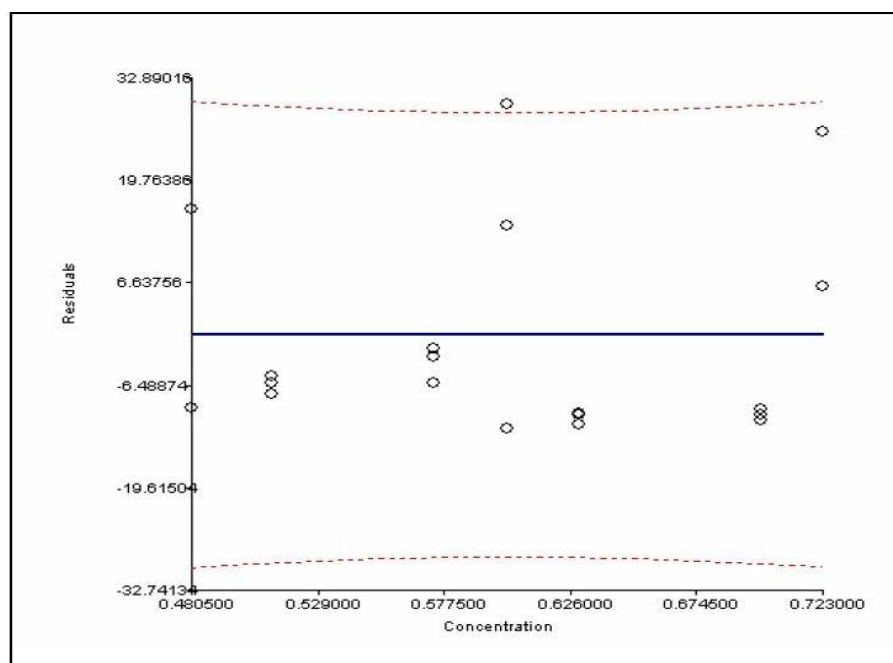


Figura 3.10. Distribuição de resíduos da linearidade de Lumefantrina - Doseamento

Tabela 3.5. Análise de variância da linearidade da Lumefantrina - Doseamento

Nível de Confiança	97,50
<i>t Student</i>	2,093
Y interceção	17,77
Declive	4063,11
Coeficiente de correlação (<i>r</i>)	0,999
Coeficiente de determinação (<i>r</i> ²)	0,999
Variância consoante a regressão (<i>SF</i> ²)	2,41e+6
Variância residual (<i>SR</i> ²)	178,06
Somatório dos quadrados residual	3383,13

Tabela 3.6. Testes estatísticos da linearidade da Lumefantrina - Doseamento

Teste de Correlação de Fisher	
Nível de confiança	97,50
Graus de Liberdade (1, 2)	1, 19
<i>F</i> tabelado	8,07
<i>F</i> calculado	1,35e+4

Compatibilidade entre Y interceção e o valor 0	
Nível de confiança	97,50
Graus de Liberdade	19
<i>t</i> tabelado	2,093
<i>t</i> calculado	0,831

3.1.2.4. Conclusão

Oteve-se correlação entre os valores de concentração das amostras em estudo e os sinais obtidos pelo sistema cromatográfico e existe dispersão linear. Concluiu-se que o método é linear para os dois ativos na gama de concentrações estudada.

3.1.3. Exatidão sobre o intervalo da linearidade

3.1.3.1. Critérios de aceitação

- A percentagem de recuperação deve ser entre os 98% - 102% para todos os níveis de concentração.
- Intervalo de confiança de 97.5%

3.1.3.2. Resultados Arteméter

Com a ajuda do *software VALIDATION MANAGER 3*, trataram-se os resultados de forma individual por ativo, usando os dados das concentrações e áreas e os diferentes testes estatísticos, apresentados nas tabelas 3.7 e 3.10 para o arteméter e a Lumefantrina, respetivamente.

Tabela 3.7. Concentrações, Áreas e Recuperação média das soluções usadas para o estudo da exatidão de Arteméter - Doseamento

Concentração (mg/mL)	Área (mAU.s)	Recuperação Média (%)
0,080	31,794	101,27
	32,564	
	31,892	
0,101	40,312	100,78
	40,604	
	40,480	
0,115	46,143	100,54
	46,844	
	45,782	

De acordo com a equação da reta da linearidade $y=mx+b$ obtiveram-se os gráficos apresentados nas figuras 3.11 e 3.12 e os testes estatísticos nas tabelas 3.8 e 3.9.

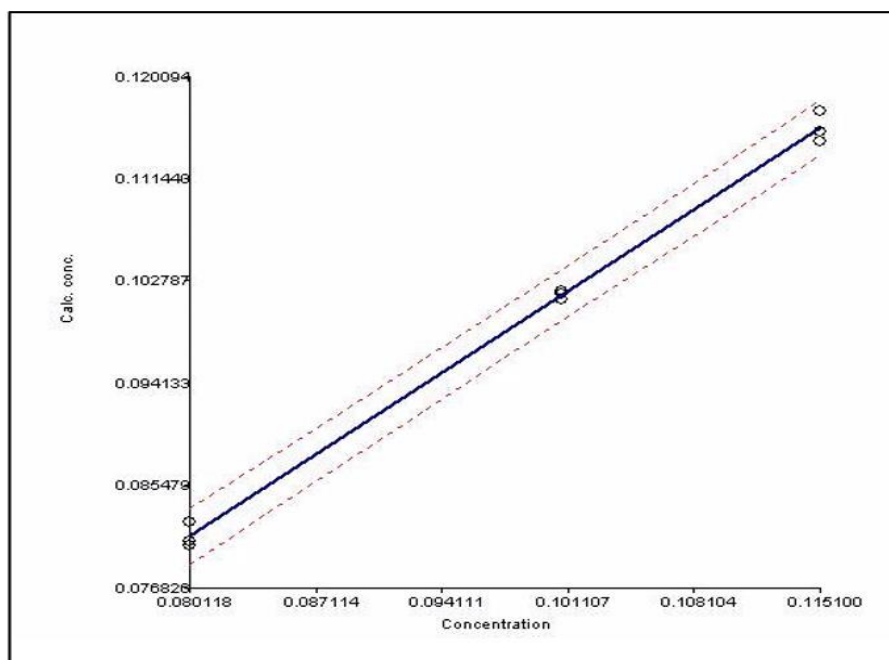


Figura 3.11. Curva de calibração da exatidão de Arteméter – Doseamento

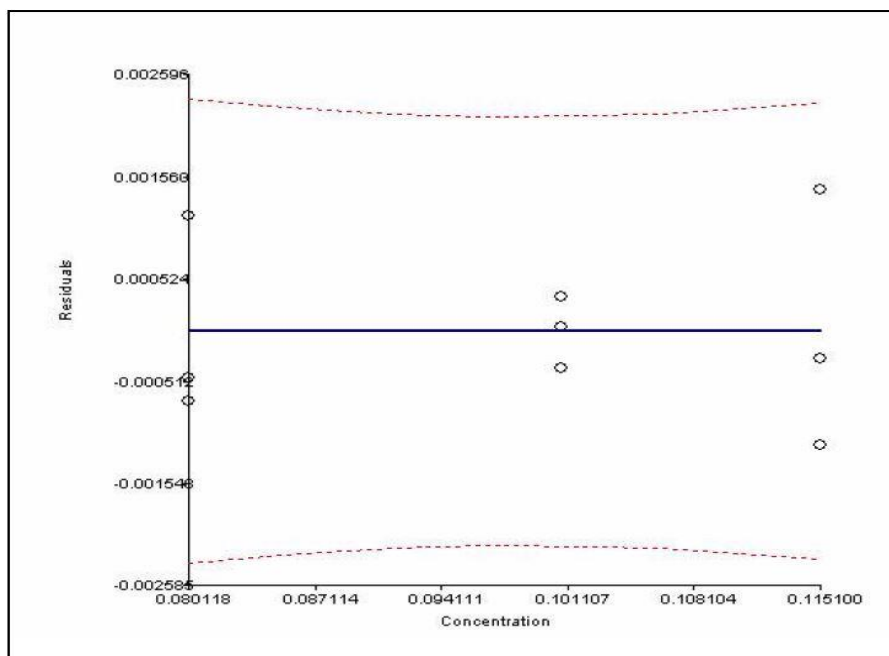


Figura 3.12. Distribuição de resíduos da exatidão de Arteméter - Doseamento

Tabela 3.8. Análise de variância da exatidão de Arteméter - Doseamento

Nível de Confiança	97,50
<i>t Student</i>	2,365
Y interceção	1,93e-03
Declive	0,99
Coeficiente de correlação (<i>r</i>)	0,998
Coeficiente de determinação (<i>r</i> ²)	0,997
Variância consoante a regressão (<i>SF</i> ²)	1,81e-03
Variância residual (<i>SR</i> ²)	8,32e-07
Somatório dos quadrados residual	5,82e-06

Tabela 3.9. Testes estatísticos da exatidão de Arteméter - Doseamento

Teste de Correlação de Fisher	
Nível de confiança	97,50
Graus de Liberdade (1, 2)	1, 7
<i>F</i> tabelado	8,070
<i>F</i> calculado	2179,761
Compatibilidade entre declive e o valor 1	
Nível de confiança	97,50
Graus de Liberdade	7
<i>t</i> tabelado	2,365
<i>t</i> calculado	0,539
Compatibilidade entre Y interceção e o valor 0	
Nível de confiança	97,50
Graus de Liberdade	7
<i>t</i> tabelado	2,365
<i>t</i> calculado	0,916

3.1.3.3. Resultados Lumefantrina

Tabela 3.10. Recuperação média da exatidão de Lumefantrina - Doseamento

Concentração (mg/mL)	Área (mAU.s)	Recuperação Média (%)
0,483	1969,836	99,47
	1969,860	
	1969,558	
0,601	2456,486	99,87
	2454,221	
	2452,522	
0,720	2919,193	99,12
	2918,207	
	2914,860	

De acordo com a equação da reta da linearidade $y=mx+b$ obtiveram-se os gráficos apresentados nas figuras 3.13 e 3.14 e os testes estatísticos nas tabelas 3.11 e 3.12.

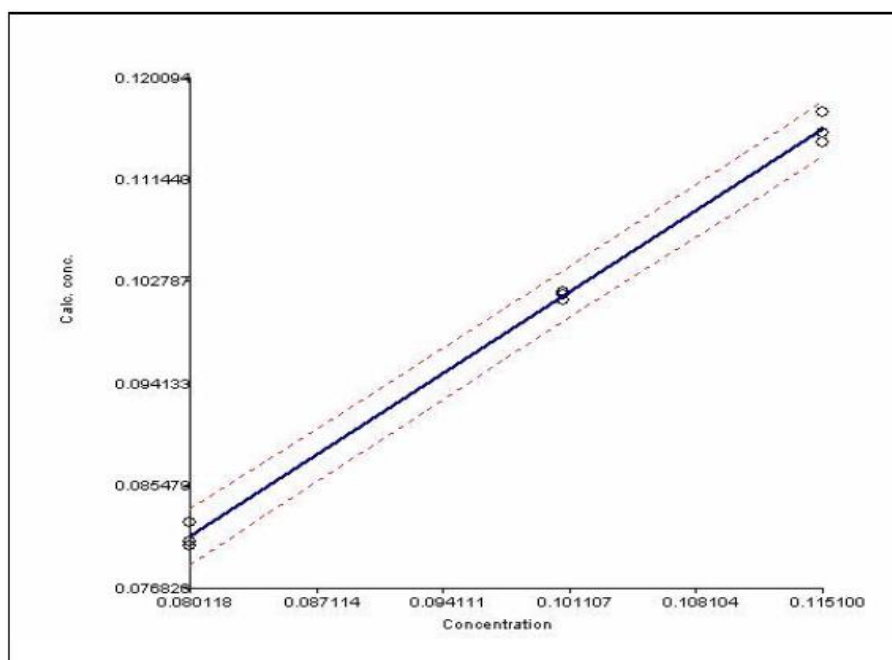


Figura 3.13. Curva de calibração da exatidão de Lumefantrina – Doseamento

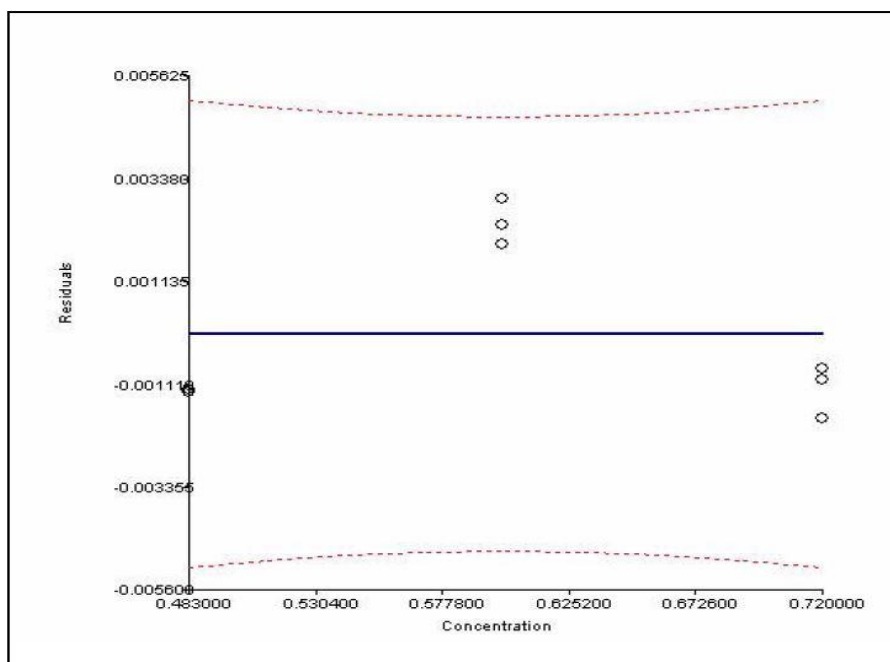


Figura 3.14. Distribuição de resíduos da exatidão de Lumefantrina - Doseamento

Tabela 3.11. Análise de variância da exatidão de Lumefantrina - doseamento

Nível de Confiança	97,50
<i>t Student</i>	2,365
Y interceção	6,38e-03
Declive	0,99
Coeficiente de correlação (<i>r</i>)	0,999
Coeficiente de determinação (<i>r</i> ²)	0,999
Variância consoante a regressão (<i>SP</i> ²)	8,16e-02
Variância residual (<i>SR</i> ²)	3,96e-06
Somatório dos quadrados residual	2,77e-05

Tabela 3.12. Testes estatísticos da exatidão de Lumefantrina - doseamento

Teste de Correlação de Fisher	
Nível de confiança	97,50
Graus de Liberdade (1, 2)	1, 7
<i>F</i> tabelado	8,07
<i>F</i> calculado	2,06e+4
Compatibilidade entre declive e o valor 1	
Nível de confiança	97,50
Graus de Liberdade	7
<i>t</i> tabelado	2,365
<i>t</i> calculado	2,33
Compatibilidade entre Y intercepção e o valor 0	
Nível de confiança	97,50
Graus de Liberdade	7
<i>t</i> tabelado	2,365
<i>t</i> calculado	1,527

3.1.3.4. Conclusão

A percentagem de recuperação está dentro do intervalo descrito nos critérios de aceitação, existe compatibilidade do Y intercepção com o valor 0 e existe compatibilidade do declive com o 1, então conclui-se que o método é válido para o parâmetro da exatidão.

3.1.4. Precisão do Sistema

3.1.4.1. Critérios de aceitação

Desvio padrão relativo (RSD) menor ou igual a 2.0%.

3.1.4.2. Resultados

Nas tabelas 3.13 e 3.14 estão apresentados os resultados obtidos para a Repetibilidade do Sistema para o método de Doseamento.

Tabela 3.13. Resultados da Repetibilidade do Sistema para Arteméter - Doseamento

Injeção	Área de Padrão (mAU.s)
1	40,76
2	39,94
3	40,10
4	40,84
5	40,56
6	40,62
Média	40,47
%RSD	0,90

Tabela 3.14. Resultados da Repetibilidade do Sistema para Lumefantrina - Doseamento

Injeção	Área de Padrão (mAU.s)
1	2363,87
2	2365,10
3	2364,53
4	2364,28
5	2364,67
6	2364,52
Média	2364,50
%RSD	0,02

3.1.4.3. Conclusão

A partir dos resultados obtidos, garante-se a precisão do sistema para ambos os ativos, uma vez que estes cumprem os critérios de aceitação.

3.1.5. Precisão

3.1.5.1. Critérios de aceitação

- Coeficiente de variação de repetibilidade ($n=6$) $\leq 3\%$
- Coeficiente de variação de precisão intermédia ($n=18$) $\leq 4\%$

3.1.5.2. Resultados Arteméter

Em seguida, apresentam-se os testes estatísticos aplicados ao ensaio da precisão, representados nas tabelas 3.15 e 3.16 para arteméter e 3.17 e 3.18 para lumefantrina. De modo a saber a concentração obtida em cada amostra, efetuou-se uma calibração para cada grupo da precisão com seis injeções de padrão, usando a concentração real do padrão:

$$Cr (Arteméter) = \frac{Q_p}{200} \times \frac{P(100 - H)}{100} \times \frac{500}{5} \times \frac{10}{5}$$

Equação 3.1. Concentração real de padrão de Arteméter

Em que:

- Qp: Peso do padrão (mg)
- P: Potência do padrão (decimais)
- H: Humidade do padrão (%)

Tabela 3.15. Quantidade em mg/comp teórico vs obtido para Arteméter - Doseamento

Grupo	Peso da Amostra (mg)	Peso Obtido (mg)
1	20,010	19,909
	20,002	19,721
	20,002	19,732
	20,000	19,929
	20,003	20,204
	20,013	19,826
2	20,005	20,332
	20,000	19,652
	20,005	20,140
	20,002	20,748
	20,015	20,016
	20,011	21,083
3	20,008	19,522
	20,005	19,708
	20,000	19,293
	20,002	19,280
	20,008	20,059
	20,150	19,992

Tabela 3.16. Análise de variância da precisão de Arteméter – Doseamento

Nível de Confiança	97,50
Graus de liberdade	17
t tabelado	2,110
Valor Médio	19,98
Intervalo de variação (%)	1,12
Variância da repetibilidade (Sr^2)	0,13
Variância da precisão intermédia (SR^2)	0,20
Coefficiente de variação de repetibilidade	1,79
Coefficiente de variação de precisão intermédia	2,25

3.1.5.3. Resultados Lumefantrina

Para a Lumefantrina, a concentração real do padrão foi determinada por:

$$Cr (Lumefantrina) = \frac{Q_p}{200} \times \frac{P(100 - H)}{100} \times \frac{500}{5} \times \frac{10}{5}$$

Equação 3.2. Concentração real de padrão de Lumefantrina

Em que:

Qp: Peso do padrão (mg)

P: Potência do padrão (decimais)

H: Humidade do padrão (%)

Tabela 3.17. Peso da amostra vs peso obtido para Lumefantrina – Doseamento

Grupo	Peso da Amostra (mg)	Peso Obtido (mg)
1	120,058	120,071
	120,010	119,283
	120,010	119,127
	120,000	119,824
	120,019	122,153
	120,078	119,736
2	120,029	120,300
	120,000	120,064
	120,029	120,492
	120,010	122,630
	120,087	122,891
	120,068	125,681
3	12,049	117,714
	120,029	118,130
	120,000	115,122
	120,010	118,178
	120,049	120,004
	120,087	119,571

Tabela 3.18. Análise de variância da precisão de Lumefantrina – Doseamento

Nível de Confiança	97,50
Graus de liberdade	17
<i>t</i> tabelado	2,110
Valor Médio	120,05
Intervalo de variação (%)	1,04
Variância da repetibilidade (Sr^2)	2,97
Variância da precisão intermédia (SR^2)	6,25
Coefficiente da variação de repetibilidade	1,43
Coefficiente da variação de precisão intermédia	2,08

3.1.5.4. Conclusão

Todos os resultados obtidos são válidos para a precisão de ambos os ativos, cumprindo com os critérios de aceitação.

3.1.6. Robustez

3.1.6.1. Critérios de aceitação

Os resultados do doseamento não devem diferir mais de $\pm 2.0\%$ do resultado obtido com as condições descritas no método ($G_n - G_1 \leq \pm 2.0\%$).

3.1.6.2. Resultados

Para o cálculo da Percentagem de Doseamento foi usada a equação 3.3:

$$\%Doseamento = \frac{A_x}{A_p} \times \frac{Q_p}{200} \times \frac{P(100 - H)}{100} \times \frac{500}{5} \times \frac{10}{5}$$

Equação 3.3. Percentagem de Doseamento

Em que:

Ax: Área do pico do arteméter no cromatograma da solução amostra ao fim de 3 horas

Ap: Média das áreas das 6 injeções da solução padrão

Qp: Quantidade de padrão (mg)

Qp: Quantidade de amostra (mg)

P: Potência do padrão (decimais)

H: Humidade do padrão (%)

Nas tabelas 3.19 e 3.20, encontram-se os resultados obtidos dos ensaios da Robustez para arteméter e Lumefantrina, respetivamente. As figuras 3.15 e 3.16 referem-se aos cromatogramas obtidos das injeções feitas com as amostras do grupo 1 e 7, respetivamente.

Tabela 3.19. Resultados de robustez para Arteméter – Doseamento

G	Modificações	RSD do Padrão (%)	Tempo Retenção (min)	Doseamento (%)	Gn-G1 (%)
1	S/Modificação	0,35	4,15	99,67	—
2	Temperatura 30°C	0,41	4,01	99,91	0,2
3	Fluxo 0,8mL/min	0,39	5,19	99,63	0,0
4	Fluxo 1,2mL/min	0,39	3,48	100,21	0,5
5	Tampão pH 2.1/ ACN (25:75)	0,47	4,25	98,67	-1,0
6	Tampão pH 2.5/ ACN (25:75)	0,57	4,27	99,53	-0,1
7	Tampão pH 2.3/ ACN (30:70)	0,25	5,09	99,54	-0,1
8	Tampão pH 2.3/ ACN (20:80)	0,30	3,44	99,74	0,1
9	Solvente Tampão/ Água/ 1-propanol/ Acetonitrilo (100:30:100:270)	0,29	4,18	101,20	1,5

Tabela 3.20. Resultados de robustez para Lumefantrina – Doseamento

G	Modificações	RSD do Padrão (%)	Tempo Retenção (min)	Doseamento (%)	Gn-G1 (%)
1	S/ Modificação	0,02	2,80	99,16	—
2	Temperatura 30°C	0,14	2,74	99,22	-0,5
3	Fluxo 0,8mL/min	0,08	3,50	99,50	-0,1
4	Fluxo 1,2mL/min	0,07	2,36	99,40	-0,2
5	Tampão pH 2.1/ ACN (25:75)	0,12	2,95	98,30	-1,4
6	Tampão pH 2.5/ ACN (25:75)	0,03	3,08	98,60	-1,1
7	Tampão pH 2.3/ ACN (30:70)	0,02	3,81	99,10	-0,5
8	Tampão pH 2.3/ ACN (20:80)	0,22	2,21	100,20	0,5
9	Solvente Tampão/ Água/ 1-propanol/ Acetonitrilo (100:30:100:270)	0,05	2,83	100,20	0,8

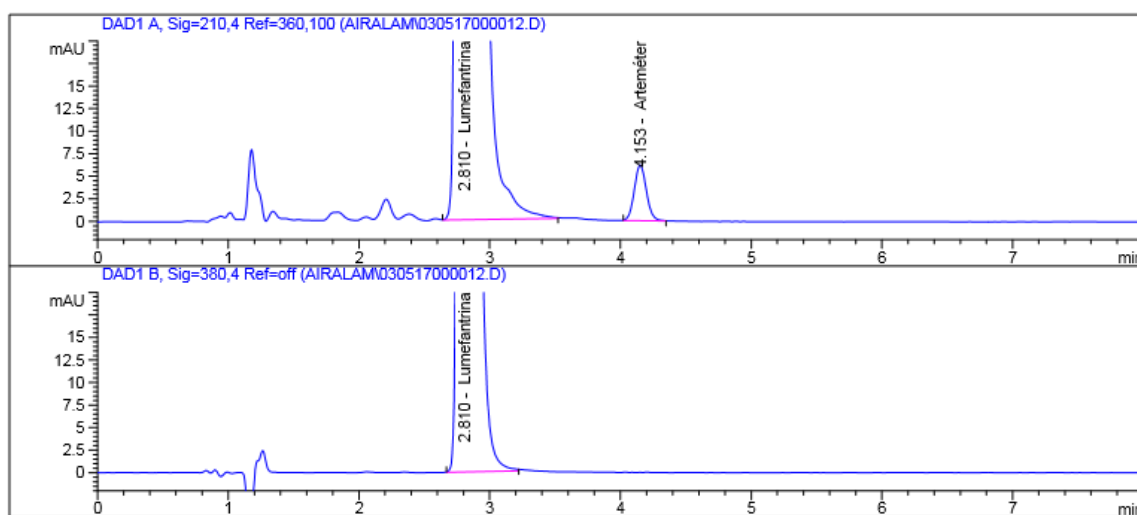


Figura 3.15. Cromatograma matriz do grupo 1. Em cima: 210 nm; em baixo: 380 nm

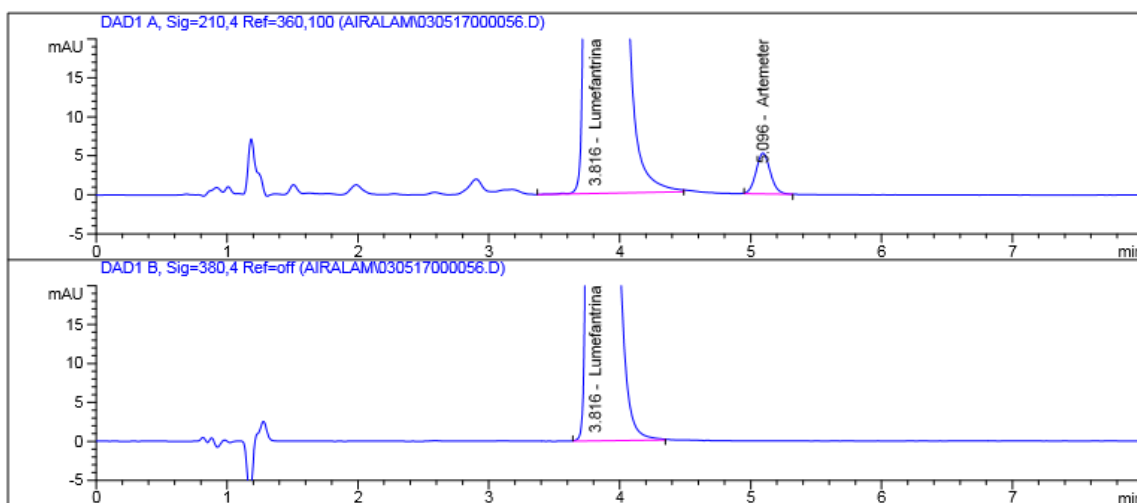


Figura 3.16. Cromatograma matriz do grupo 7. Em cima: 210 nm; em baixo: 380 nm

3.1.6.3. Conclusão

Os resultados obtidos cumprem os critérios de aceitação, podendo confirmar-se que não há diferenças significativas entre as amostras analisadas nas várias condições testadas, considerou-se, assim, que o método de doseamento é robusto para ambos os ativos. Existe apenas uma variação dos tempos de retenção dos ativos entre grupos (ver cromatogramas acima), onde o tempo de retenção de ambos os ativos aumenta cerca de 1 minuto do grupo 1 para o grupo 7, devido à alteração das proporções da fase móvel, havendo uma diminuição na quantidade de orgânico (acetonitrilo) que retarda a saída do pico de ativo. O mesmo acontece quando se diminui o fluxo de fase móvel no sistema cromatográfico. Esta variação verifica-se na solução amostra e na solução padrão.

3.1.7. Estabilidade

3.1.7.1. Critérios de aceitação

Os resultados do doseamento dos vários tempos testados não devem diferir mais de $\pm 2.0\%$ do resultado obtido com o tempo 0 horas ($G_n - G_1 \leq \pm 2.0\%$). O último valor de doseamento dentro do intervalo especificado ($\pm 2\%$) para as amostras e/ou padrão de verificação deve determinar o tempo de estabilidade da solução

3.1.7.2. Resultados

Nas tabelas 3.21 e 3.22, consolidam-se os resultados obtidos do ensaio de estabilidade das soluções para ambos os ativos.

Tabela 3.21. Resultados de estabilidade para Arteméter – Doseamento

Tempo (hora)	RSD do Padrão (%)	Área Média Padrão (mAUs)	Área Média Amostra (mAUs)	Doseamento (%)	Gn-G1 (%)
0	0,89	67452,00	66200,67	99,13	-
10	1,02	69245,50	66795,33	97,43	-1,70
20	1,55	68744,17	66143,33	97,18	-1,90
30	1,57	66940,00	65043,33	98,14	-1,00

Tabela 3.22. Resultado de estabilidade para Lumefantrina – Doseamento

Tempo (hora)	RSD do Padrão (%)	Área Média Padrão (mAUs)	Área Média Amostra (mAUs)	Doseamento (%)	Gn-G1 (%)
0	0,46	2275501,67	2196045,00	99,78	-
10	0,33	2306493,33	2210112,00	99,07	-0,71
20	0,29	2328614,17	2223040,33	98,70	-1,08
30	0,45	2349537,50	2239779,67	98,56	-1,22

3.1.7.3. Conclusão

Com base nos resultados obtidos, verifica-se que os critérios de aceitação foram cumpridos e que as soluções são estáveis pelo menos 30h para ambos os ativos.

3.2. Dissolução

3.2.1. Dissolução Arteméter

3.2.1.1. Especificidade

3.2.1.1.1. Critérios de aceitação

- Não devem aparecer picos a interferir com o pico de ativo.

3.2.1.1.2. Resultados

De seguida, apresentam-se os cromatogramas obtidos (figuras 3.17 à 3.21), correspondentes às injeções feitas no sistema cromatográfico, com o ensaio da especificidade.

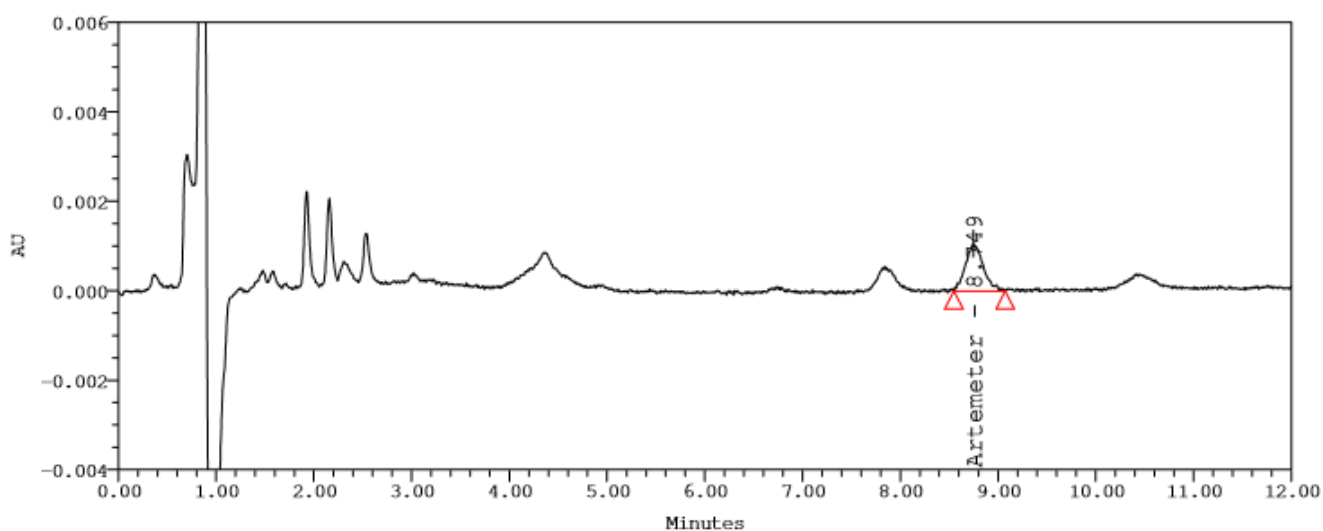


Figura 3.17. Cromatograma solvente da especificidade de Arteméter – Dissolução

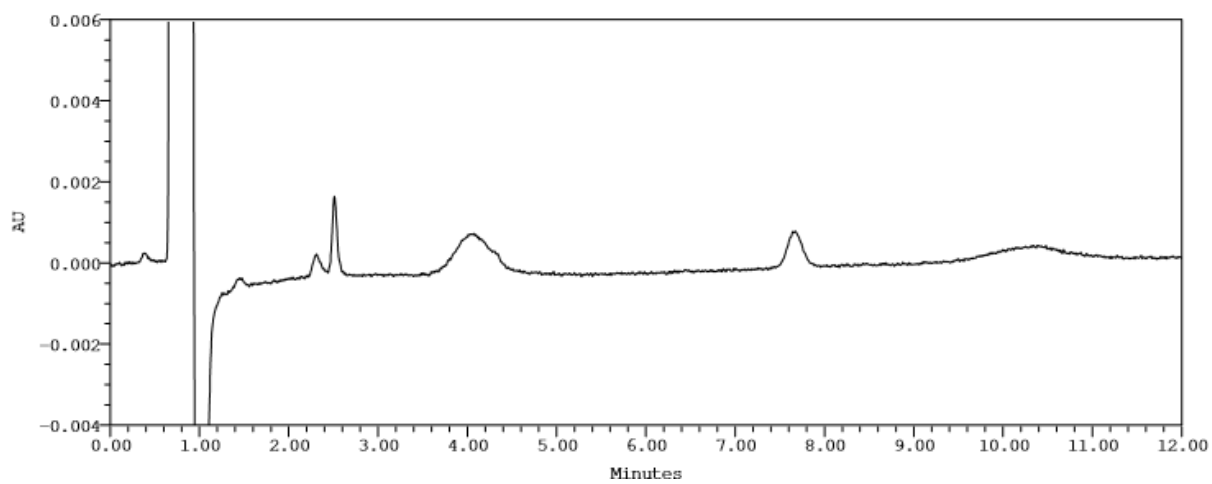


Figura 3.18. Cromatograma Placebo da especificidade de Arteméter – Dissolução

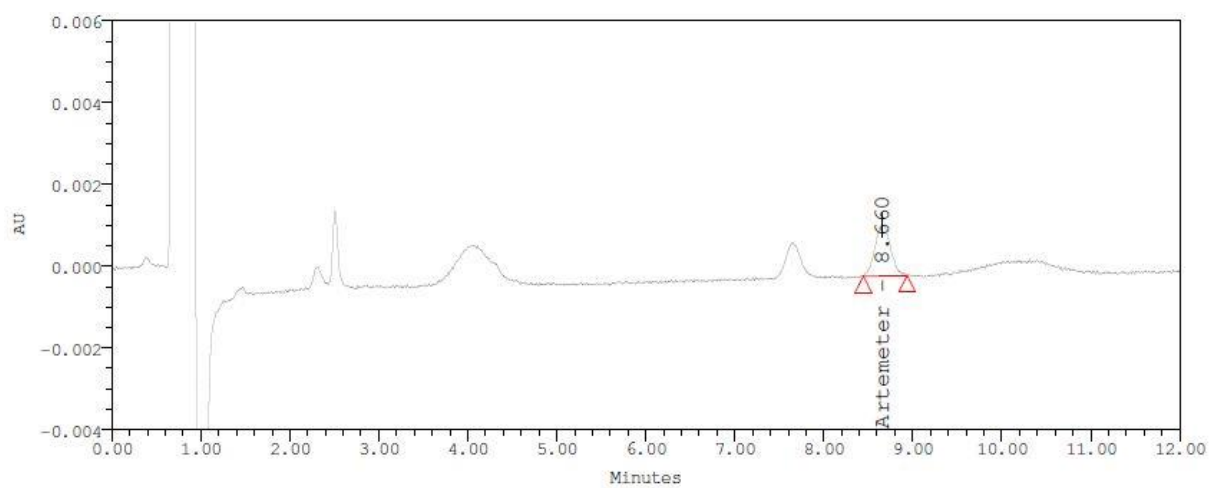


Figura 3.19. Cromatograma padrão 100% da especificidade de Arteméter – Dissolução

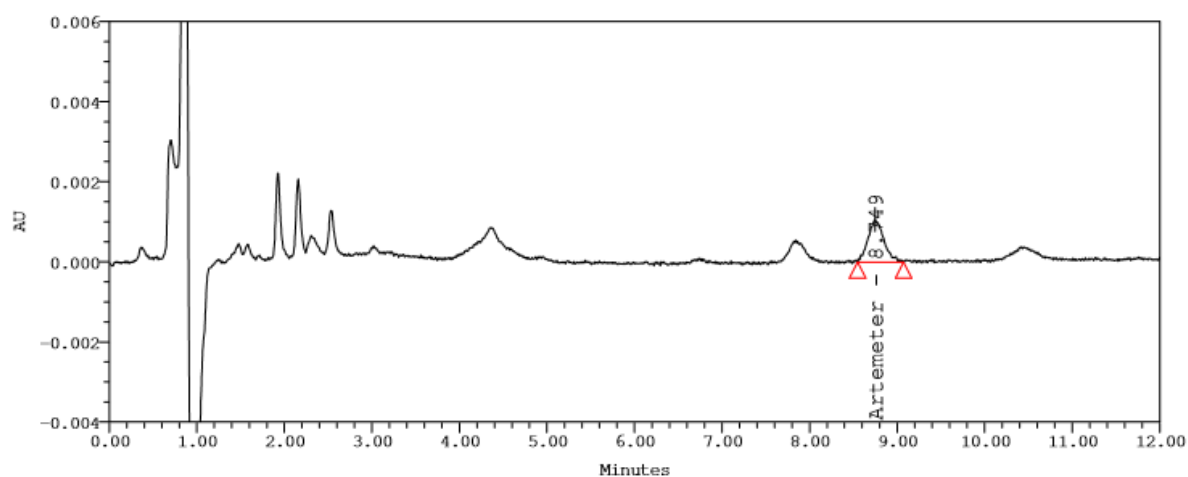


Figura 3.20. Cromatograma matriz da especificidade de Artemeter – Dissolução

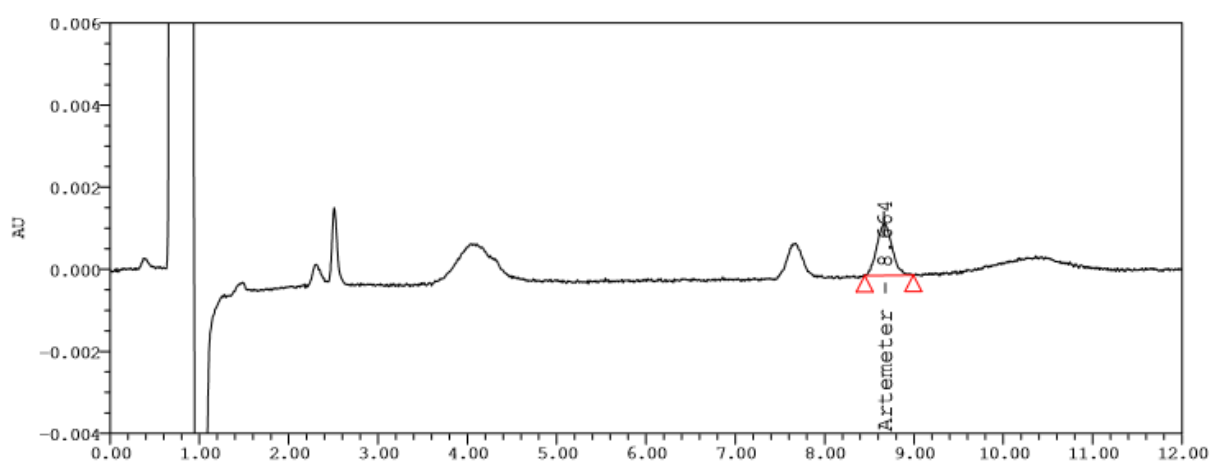


Figura 3.21. Cromatograma do comprimido dissolvido da especificidade de Artemeter – Dissolução

3.2.1.1.3. Conclusão

Pela análise dos cromatogramas das soluções injetadas, concluiu-se que não há interferentes com o mesmo tempo de retenção do pico de ativo e que o pico do outro ativo (Lumefantrina) não aparece em nenhum cromatograma, tendo em conta as condições de dissolução e cromatográficas.

3.2.1.2. Linearidade

3.2.1.2.1. Critérios de aceitação

- O coeficiente de correlação, $r \geq 0,995$
- Correlação entre a concentração do ativo e os sinais obtido ($F_{\text{calculado}} \geq F_{\text{tabelado}}$)
- Compatibilidade do valor de Y- interceção com o valor 0 ($t_{\text{calculado}} \leq t_{\text{tabelado}}$)

3.2.1.2.2. Resultados

Com auxílio do *software VALIDATION MANAGER 3*, foram tratados os dados apresentados na tabela 3.23 e realizados os diferentes testes estatísticos, conforme as tabelas 3.24 e 3.25.

Tabela 3.23. Concentração das soluções e Áreas obtidas da Linearidade de Arteméter - Dissolução

Concentração (mg/mL)	Área (mAU.s)
0,008	5060,00
	5400,00
	5646,00
0,010	7794,00
	7415,00
	7759,00
0,012	9360,00
	9188,00
	9375,00
0,016	12667,00
	12109,00
	12284,00
0,018	14117,00
	13862,00
	14504,00
0,020	15174,00
	15291,00
	15639,00
0,023	17639,00
	17511,00
	16472,00

De acordo com a equação da reta da linearidade $y=mx+b$ obtiveram-se os gráficos apresentados nas figuras 3.22 e 3.23.

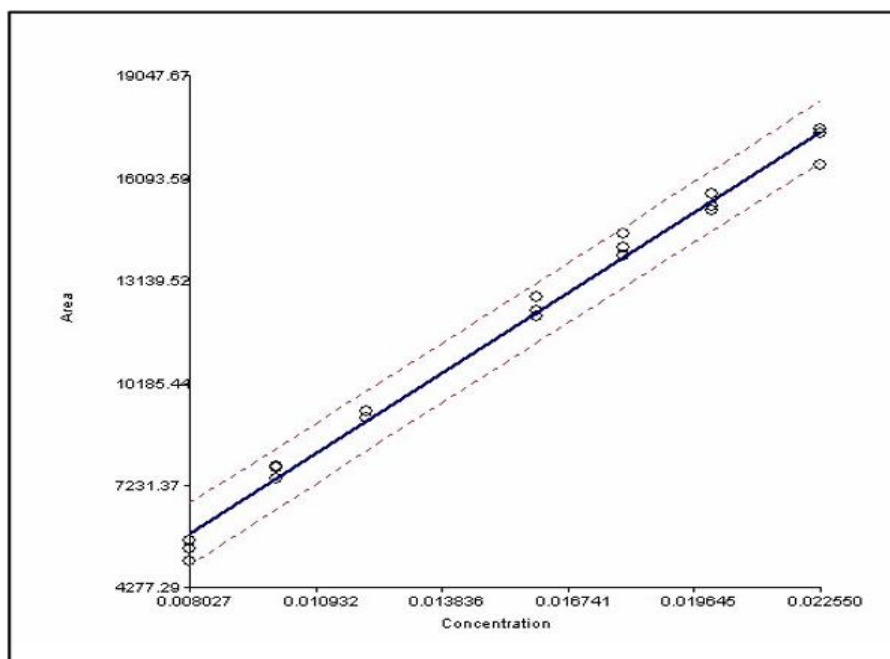


Figura 3.22. Curva de calibração da linearidade de Arteméter – Dissolução

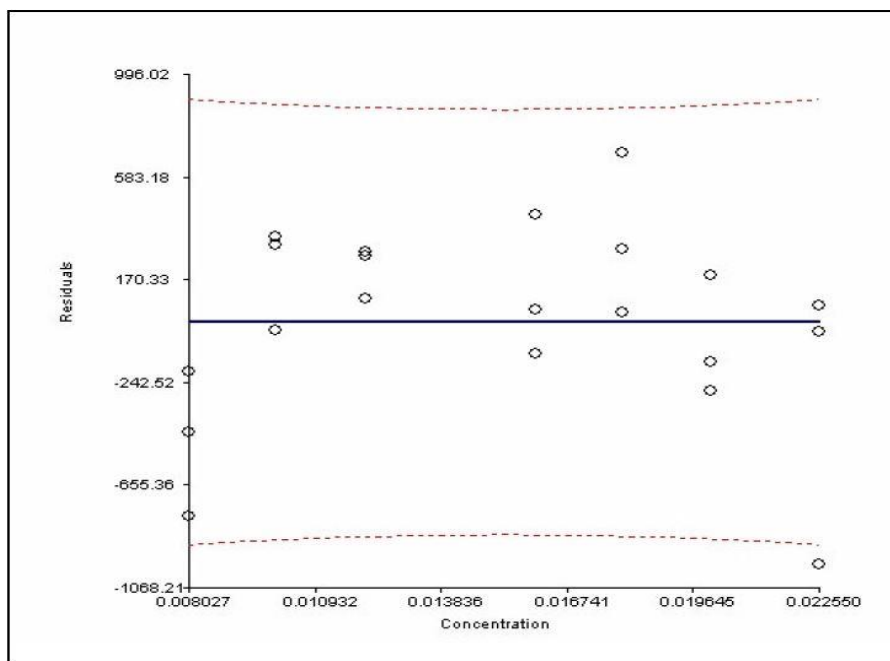


Figura 3.23. Distribuição de resíduos da linearidade de Arteméter – Dissolução

Tabela 3.24. Análise de variância da linearidade de Arteméter – Dissolução

Nível de Confiança	97,50
<i>t Student</i>	2,093
Y interceção	-568,55
Declive	7,99e+8
Coefficiente de correlação (<i>r</i>)	0,995
Coefficiente de determinação (<i>r</i> ²)	0,991
Variância consoante a regressão (<i>SR</i> ²)	3,33e+8
Variância residual (<i>SR</i> ²)	1,62e+5
Somatório dos quadrados residual	3,08e+6

Tabela 3.25. Testes estatísticos da linearidade de Arteméter – Dissolução

Teste de Correlação de Fisher	
Nível de confiança	97,50
Graus de Liberdade (1, 2)	1, 19
F tabelado	5,920
F calculado	2054,710
Compatibilidade entre Y interceção e o valor 0	
Nível de confiança	97,50
Graus de Liberdade	19
<i>t</i> tabelado	3,660
<i>t</i> calculado	3,249

3.2.1.2.3. Conclusão

Concluiu-se que o método é linear para o Arteméter na gama de concentrações estudada, pois existe correlação entre os valores de concentração e os sinais obtidos do sistema cromatográfico, os testes estatísticos realizados são válidos e o coeficiente de correlação está segundo os critérios de aceitação.

3.2.1.3. Exatidão sobre o intervalo da linearidade

3.2.1.3.1. Critérios de aceitação

- A percentagem de recuperação deve ser entre os 80% - 110% para todos os níveis de concentração.
- Intervalo de confiança de 97.5%

3.2.1.3.2. Resultados

Na tabela 3.26 estão os resultados obtidos do sistema cromatográfico:

Tabela 3.26. Concentração, Áreas e Recuperação média da exatidão de Arteméter – Dissolução

Concentração (mg/mL)	Área (mAU.s)	Recuperação Média (%)
0,012	7499,00	89,70
	8824,00	
	8218,00	
0,016	10678,00	88,19
	11370,00	
	10629,00	
0,020	13899,00	91,62
	14226,00	
	14174,00	

De acordo com a equação da reta da linearidade $y=mx+b$ obtiveram-se os gráficos apresentados nas figuras 3.24 e 3.25 e os testes estatísticos nas tabelas 3.27 e 3.28.

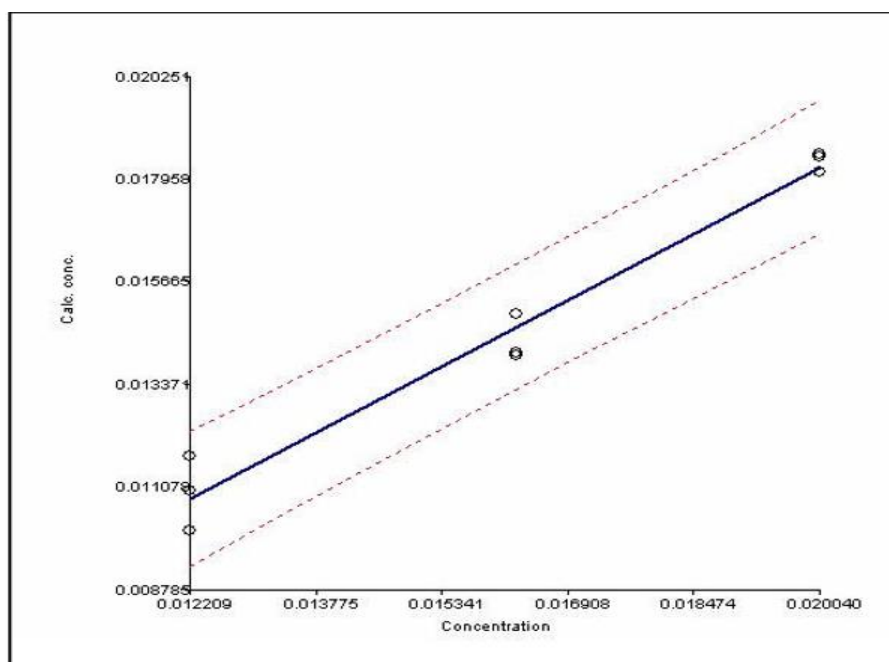


Figura 3.24. Curva de calibração da exatidão de Arteméter – Dissolução

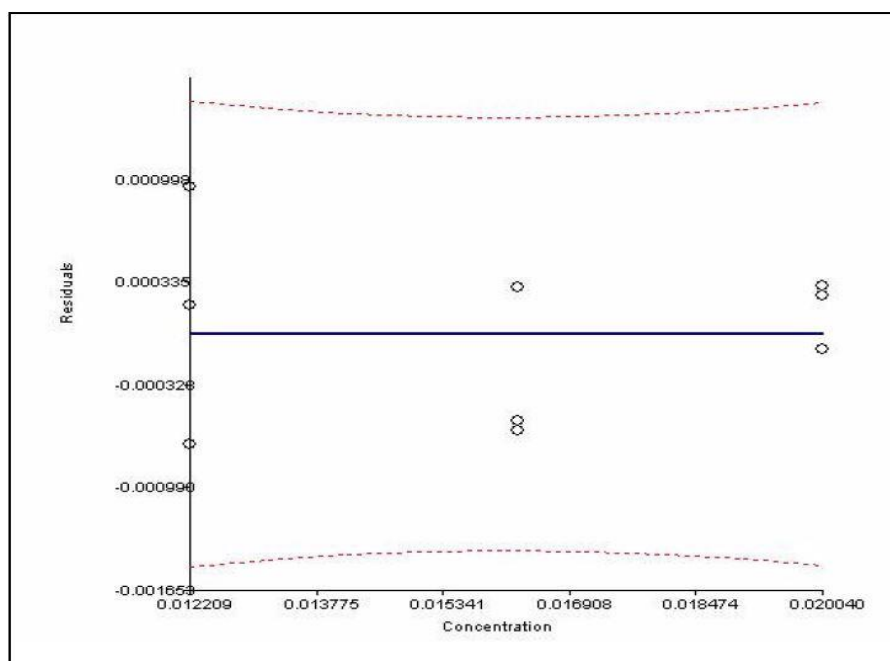


Figura 3.25. Distribuição de resíduos da exatidão de Arteméter – Dissolução

Tabela 3.27. Análise de variância da exatidão de Arteméter – Dissolução

Nível de Confiança	97,50
<i>t Student</i>	2,365
Y interceção	-7.27e-4
Declive	0,99
Coefficiente de correlação (<i>r</i>)	0,99
Coefficiente de determinação (<i>r</i> ²)	0,97
Variância consoante a regressão (<i>S</i> ²)	8,21e-5
Variância residual (<i>S</i> ²)	3,44e-7
Somatório dos quadrados residual	2,41e-6

Tabela 3.28. Testes estatísticos da exatidão de Arteméter – Dissolução

Teste de Correlação de Fisher	
Nível de confiança	97,50
Graus de Liberdade (1, 2)	1, 7
<i>F</i> tabelado	8,070
<i>F</i> calculado	238,506
Compatibilidade entre declive e o valor 1	
Nível de confiança	97,5
Graus de Liberdade	7
<i>t</i> tabelado	2,365
<i>t</i> calculado	0,903
Compatibilidade entre Y intercepção e o valor 0	
Nível de confiança	97,5
Graus de Liberdade	7
<i>t</i> tabelado	2,365
<i>t</i> calculado	0,720

3.2.1.3.3. Conclusão

Segundo os resultados obtidos, as taxas de recuperação média para todas as concentrações estão dentro do intervalo descrito nos critérios de aceitação para a exatidão do método de dissolução de Arteméter, e os testes estatísticos realizados foram satisfatórios.

3.2.1.4. Precisão do Sistema

3.2.1.4.1. Critérios de aceitação

Desvio padrão relativo (RSD) inferior ou igual a 2%.

3.2.1.4.2. Resultados

Na tabela 3.29, estão apresentados os resultados obtidos para a Repetibilidade do Sistema do ensaio de Dissolução.

Tabela 3.29. Resultados da Repetibilidade do Sistema para Arteméter – Dissolução

Injeção	Área de Padrão (mAU.s)
1	15162
2	15113
3	15315
4	15227
5	14767
6	14917
Média	15083,50
%RSD	1,36

3.2.1.4.3. Conclusão

Os resultados obtidos para a Repetibilidade do Sistema cumprem os critérios de aceitação estabelecidos.

3.2.1.5. Precisão

3.2.1.5.1. Critérios de aceitação

- Coeficiente de variação de repetibilidade (n=6) $\leq 3\%$
- Coeficiente de variação de precisão intermédia (n=18) $\leq 4\%$

3.2.1.5.2. Resultados

De modo a saber a concentração obtida em cada amostra, fez-se uma calibração para cada grupo da precisão com seis injeções de padrão, usando a concentração real do padrão. Na tabela 3.30 estão os dados obtidos através do sistema cromatográfico para os três grupos da precisão, e na tabela 3.31 apresenta m-se os testes estatísticos aplicados ao ensaio da precisão.

Tabela 3.30. Concentração das soluções e Áreas obtidas da Precisão de Arteméter – Dissolução

Grupo	Concentração Amostra (mg/mL)	Área da Amostra (mAU.s)
1	0.020	15666
	0.020	15122
	0.020	15720
	0.020	16574
	0.020	15817
	0.020	15845
2	0.019	15776
	0.021	16291
	0.020	16154
	0.020	16092
	0.020	16237
	0.020	16544
3	0.020	15677
	0.020	16789
	0.020	16570
	0.020	16539
	0.020	16764
	0.020	15764

Tabela 3.31. Análise de variância da precisão de Arteméter – Dissolução

Nível de Confiança	97,50
Graus de liberdade	17
t tabelado	2,110
Área Média das Amostras	16107,83
Intervalo de variação (%)	1,48
Variância da repetibilidade (Sr^2)	1,77e+5
Variância da precisão intermédia (SR^2)	5,31e+4
Coefficiente de variação de repetibilidade	2,61
Coefficiente de variação de precisão intermédia	2,98

3.2.1.5.3. Conclusão

Os resultados obtidos dos testes estatísticos aplicados ao ensaio da precisão são satisfatórios e cumprem-se os critérios de aceitação.

3.2.1.6. Robustez

3.2.1.6.1. Critérios de aceitação

Desvio em relação a resposta inicial inferior a 2.0 % ($G_n - G_1 \leq \pm 2.0\%$).

3.2.1.6.2. Resultados

Na tabela 3.32, estão descritas as diferentes alterações aplicadas ao método da dissolução, bem como os resultados obtidos. Foram usados três grupos sem modificação como método de comparação com os outros grupos, dado que os ensaios e injeções não foram todos realizados no mesmo dia. Entre a figura 3.26 e 3.30 estão representados os cromatogramas dos ensaios de robustez que se verificaram fora dos critérios de aceitação.

Tabela 3.32. Resultados obtidos da robustez de Arteméter – Dissolução

G	Modificações	RSD do Padrão (%)	Tempo Retenção (min)	Dissolução (%)	Gn-G1 (%)
1	S/ Modificação	1,86	8.966	99,7	—
3	Fluxo 0,8mL/min	1,69	11.286	100,1	0,5
4	Fluxo 1,2mL/min	1,76	7.521	99,6	-0,1
5	Tampão pH 2,3/ ACN (35:65)	2,00	6.236	97,3	-2,4
6	Tampão pH 2,3/ ACN (45:55)		11,245		
1	S/ Modificação	1,27	8.827	102,4	—
2	Temperatura 30°C	1,55	8.343	108,8	6,4
7	Tampão pH 2,1/ ACN (40:60)	1,41	8.763	102,9	0,5
8	Tampão pH 2,5/ ACN (40:60)	1,91	9.134	103,8	1,5
1	S/ Modificação	1,04	9.172	106,9	—
9	Filtros papel 41	1,90	9.026	105,9	-1,0
10	Filtros GF/C	1,85	9.060	100,2	-6,7

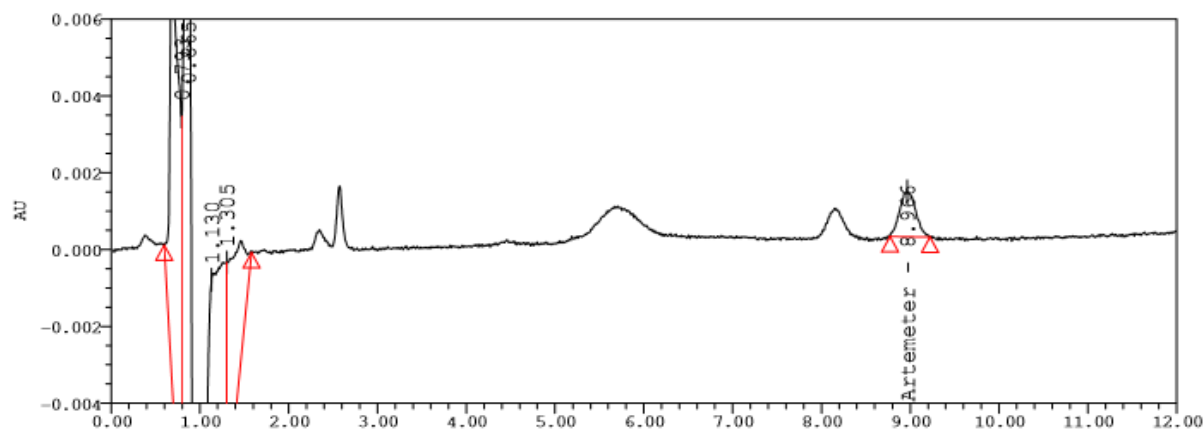


Figura 3.26. Cromatograma Grupo 1 da Robustez de Arteméter - Dissolução

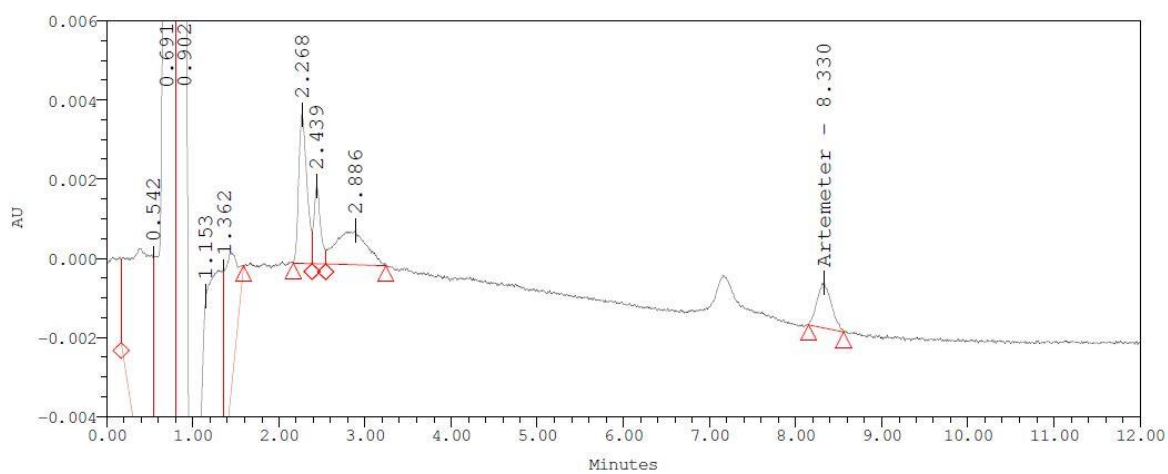


Figura 3.27. Cromatograma Grupo 2 da Robustez de Arteméter – Dissolução

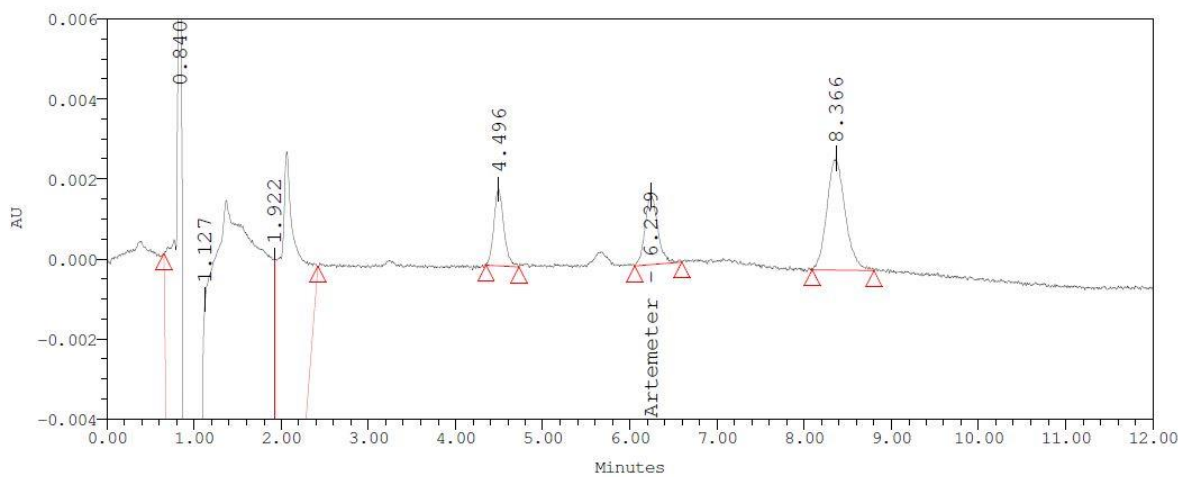


Figura 3.28. Cromatograma Grupo 5 da Robustez de Arteméter - Dissolução

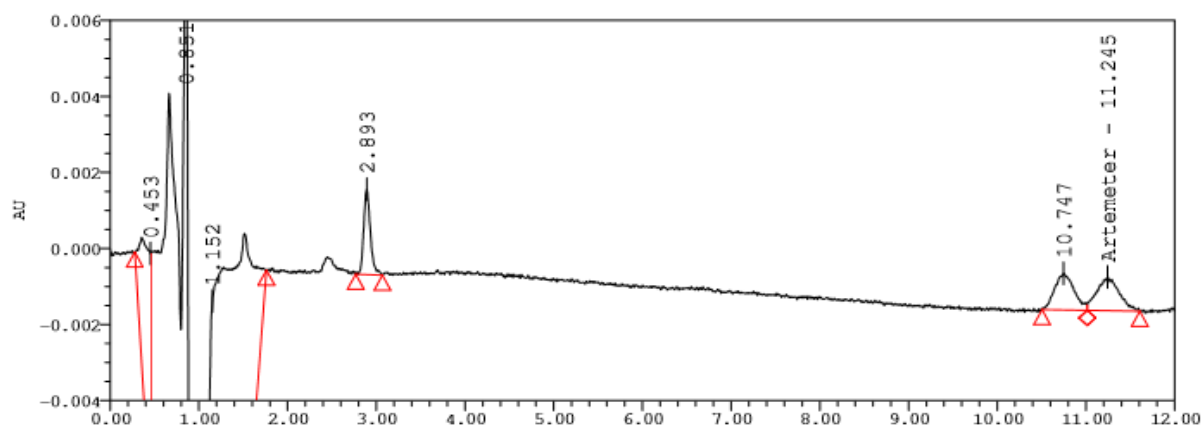


Figura 3.29. Cromatograma Grupo 6 da Robustez de Arteméter – Dissolução

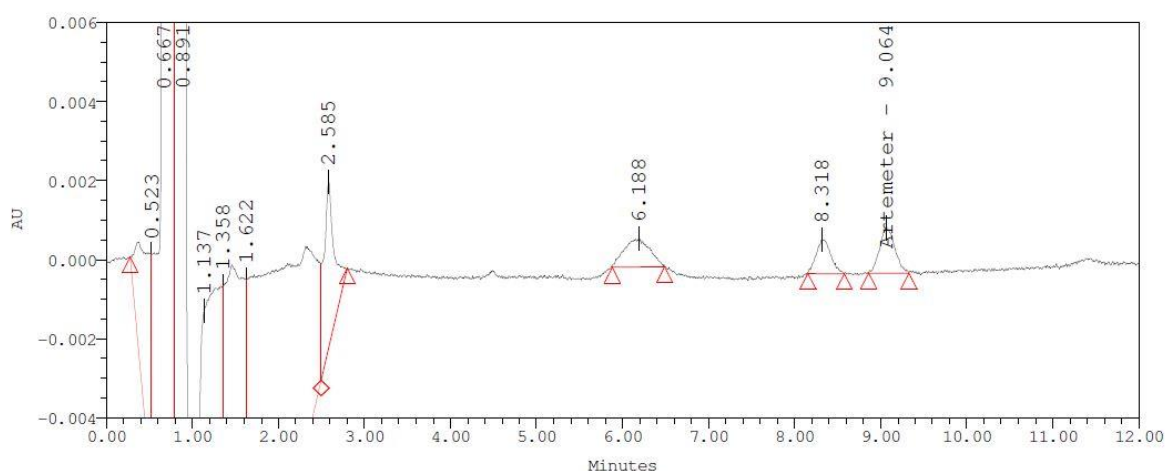


Figura 3.30. Cromatograma Grupo 10 da Robustez de Arteméter – Dissolução

3.2.1.6.3. Conclusão

Com base nos resultados obtidos, verificou-se que o método não é robusto para o Arteméter nos grupos em que existe alteração da proporção da fase móvel, quando se aumenta a temperatura da coluna e quando se usam os filtros GF/C.

Nos grupos 5 e 6 verificou-se que a variação das proporções da fase móvel tem impacto significativo no sistema cromatográfico. Notou-se com maior nitidez essa variação no grupo 6, onde o pico de ativo surge colado a um pico de solvente, como é possível observar no cromatograma acima. Isto acontece por causa do aumento da percentagem de tampão em relação ao orgânico, originando uma maior afinidade do ativo à fase estacionária e provocando um aumento do tempo de retenção do pico de solvente, colidindo com o pico de Arteméter.

No grupo 2, o aumento da temperatura da coluna provocou instabilidade no sistema cromatográfico, principalmente na linha de base, o que justifica os resultados encontrarem-se fora dos limites e critérios de aceitação. No grupo 10, a alteração no filtro utilizado na preparação das amostras provocou uma

diminuição na percentagem de dissolução das amostras, ficando fora do limite estabelecido pelos critérios de aceitação.

Ainda assim conclui-se que o método da dissolução de Arteméter é válido para o parâmetro da robustez. Terá de se fazer posteriormente uma referência no protocolo de análise, que para este método o analista deverá controlar a temperatura da coluna, medir rigorosamente as quantidades de acetonitrilo e tampão da fase móvel e usar apenas os filtros referidos no método.

3.2.1.7. Estabilidade

3.2.1.7.1. Critérios de aceitação

Os resultados da dissolução dos vários tempos testados não devem diferir mais de $\pm 2.0\%$ do resultado obtido com o tempo 0 horas ($G_n - G_1 \leq \pm 2.0\%$).

O último valor da dissolução dentro do intervalo especificado ($\pm 2\%$) para as amostras e/ou padrão de verificação, determina o tempo de estabilidade da solução.

3.2.1.7.2. Resultados

Na tabela 3.33, apresentam-se os resultados obtidos do ensaio de estabilidade das soluções.

Tabela 3.33. Resultados de estabilidade das soluções para Arteméter - dissolução

Tempo (hora)	RSD do Padrão (%)	Área Média Padrão (mAU.s)	Área Média Amostra (mAU.s)	Dissolução (%)	Gn-G1 (%)
0	1,86	15354,33	15128,67	97,76	—
10	1,38	14773,17	15102,67	101,43	3,70
20	1,74	13657,83	13896,00	100,95	3,20
30	1,22	14561,33	15485,00	105,51	7,80

3.2.1.7.3. Conclusão

Verificou-se que o sistema não é estável, devido à variação da área do padrão. Assim, se a análise decorrer além das 10 horas, é necessária a preparação de uma nova solução padrão para a quantificação das amostras para além das 10 horas de injeção.

3.2.2. Dissolução Lumefantrina

3.2.2.1. Especificidade

3.2.2.1.1. Critérios de aceitação

- Não devem aparecer picos a interferir com o pico de ativo.

3.2.2.1.2. Resultados

De seguida, estão os cromatogramas obtidos (da figura 3.31 à 3.35), correspondentes às injeções feitas no sistema cromatográfico, com o ensaio da especificidade.

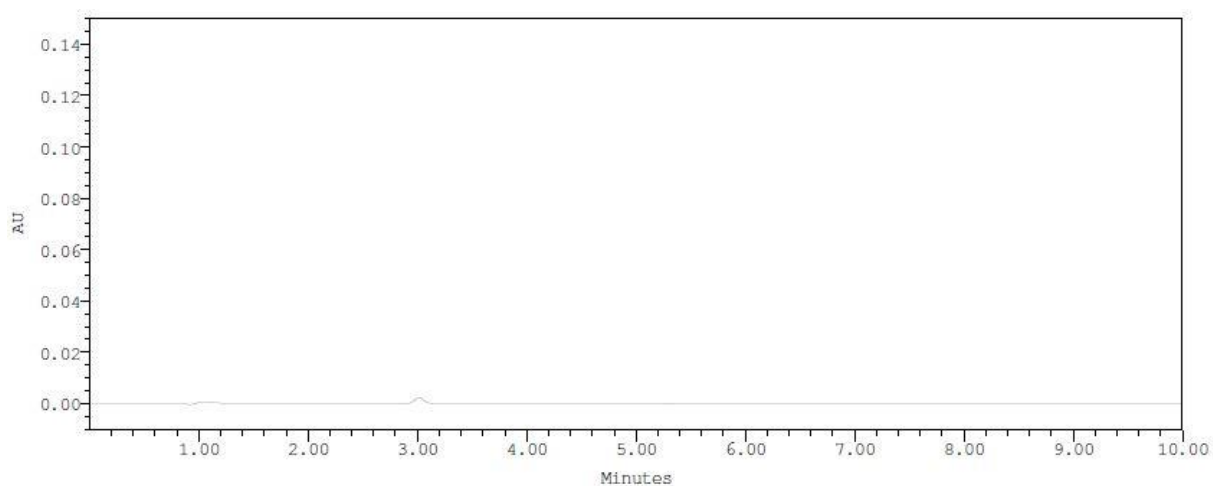


Figura 3.31. Cromatograma solvente da especificidade de Lumefantrina – Dissolução

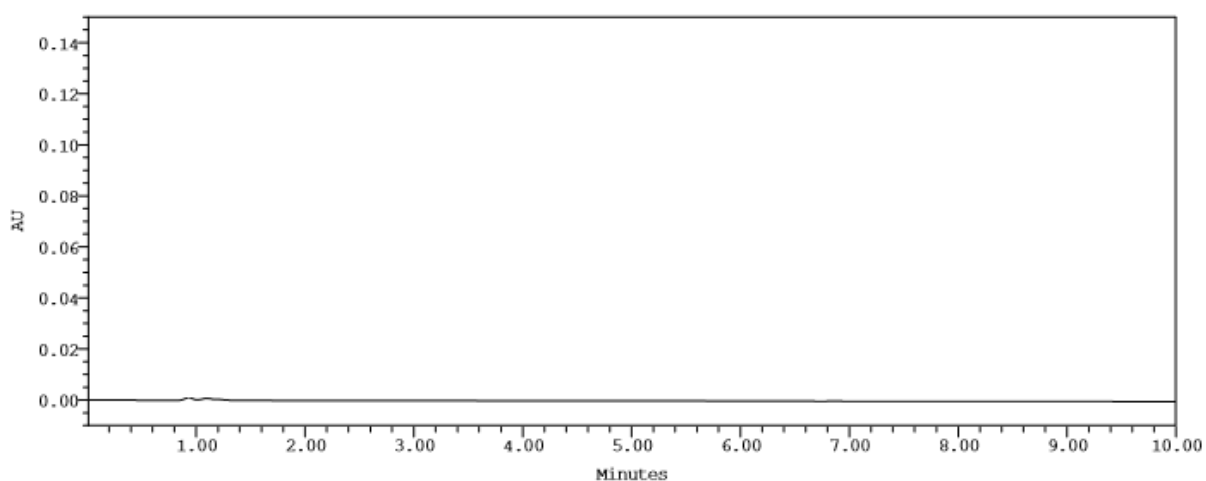


Figura 3.32. Cromatograma placebo da especificidade de Lumefantrina – Dissolução

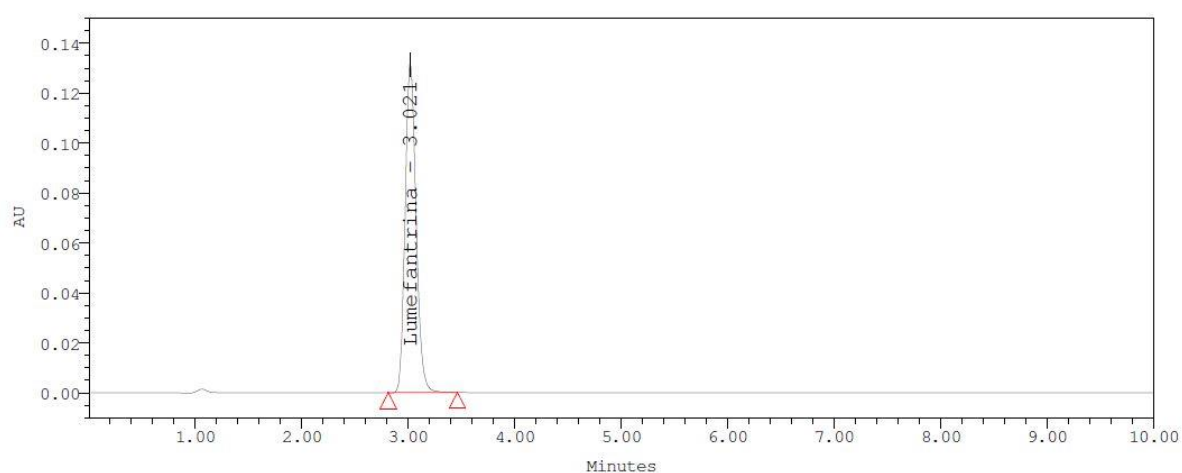


Figura 3.33. Cromatograma padrão 100% da especificidade de Lumefantrina – Dissolução

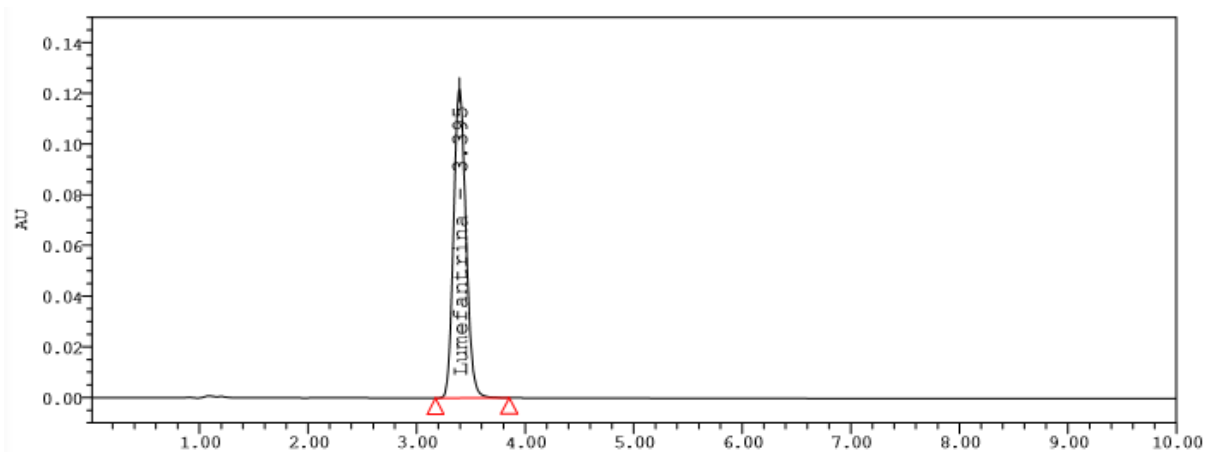


Figura 3.34. Cromatograma matriz da especificidade de Lumefantrina – Dissolução

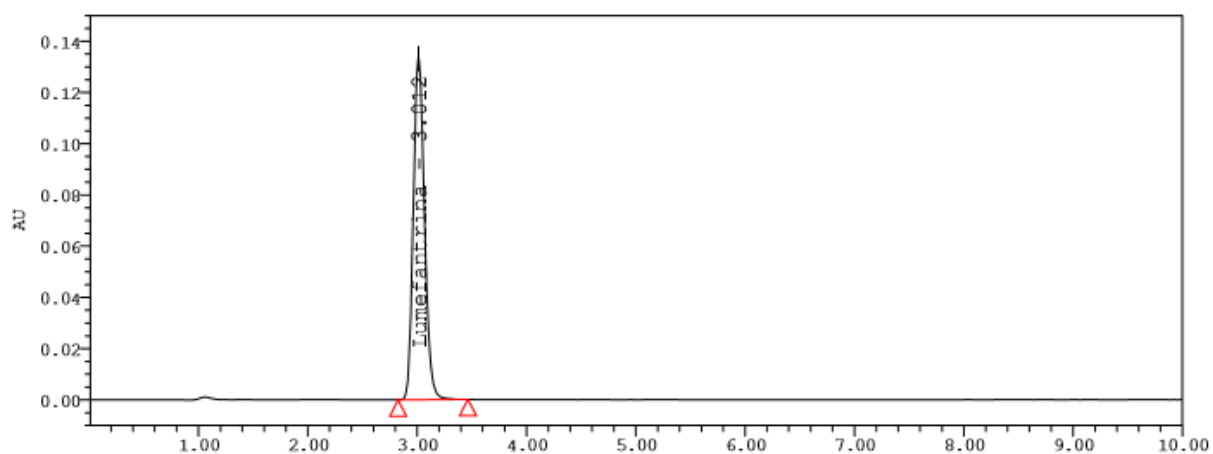


Figura 3.35. Cromatograma do comprimido dissolvido da especificidade de Lumefantrina – Dissolução

3.2.2.1.3. Conclusão

Pela análise dos cromatogramas das soluções injetadas, concluiu-se que não há interferentes com o mesmo tempo de retenção do pico de ativo, e que o pico do outro ativo (Arteméter) não aparece em nenhum cromatograma e, portanto, não interfere com o pico da Lumefantrina com estas condições de dissolução e cromatográficas.

3.2.2.2. Linearidade

3.2.2.2.1. Critérios de aceitação

- O coeficiente de correlação, $r \geq 0.995$
- Correlação entre a concentração do ativo e os sinais obtido ($F_{\text{calculado}} \geq F_{\text{tabelado}}$)
- Compatibilidade do valor de Y- interceção com o valor 0 ($t_{\text{calculado}} \leq t_{\text{tabelado}}$)

3.2.2.2.2. Resultados

Com auxílio do *software VALIDATION MANAGER 3*, foram tratados os seguintes dados apresentados na tabela 3.34, e realizados os diferentes testes estatísticos presentes nas tabelas 3.35 e 3.36.

Tabela 3.34. Concentração das soluções e Áreas obtidas da Linearidade de Lumefantrina – Dissolução

Concentração (mg/mL)	Área (mAU.s)
0,024	183397,00
	183400,00
	183436,00
0,048	369709,00
	369642,00
	369862,00
0,072	567997,00
	567695,00
	566348,00
0,096	758395,00
	757819,00,
	757136,00
0,108	845583,00
	843875,00
	843486,00
0,120	940044,00
	939854,00
	939677,00
0,132	1041570,00
	1039281,00
	1040845,00

De acordo com a equação da reta da linearidade $y=mx+b$ obtiveram-se os gráficos apresentados nas figuras 3.36 e 3.37.

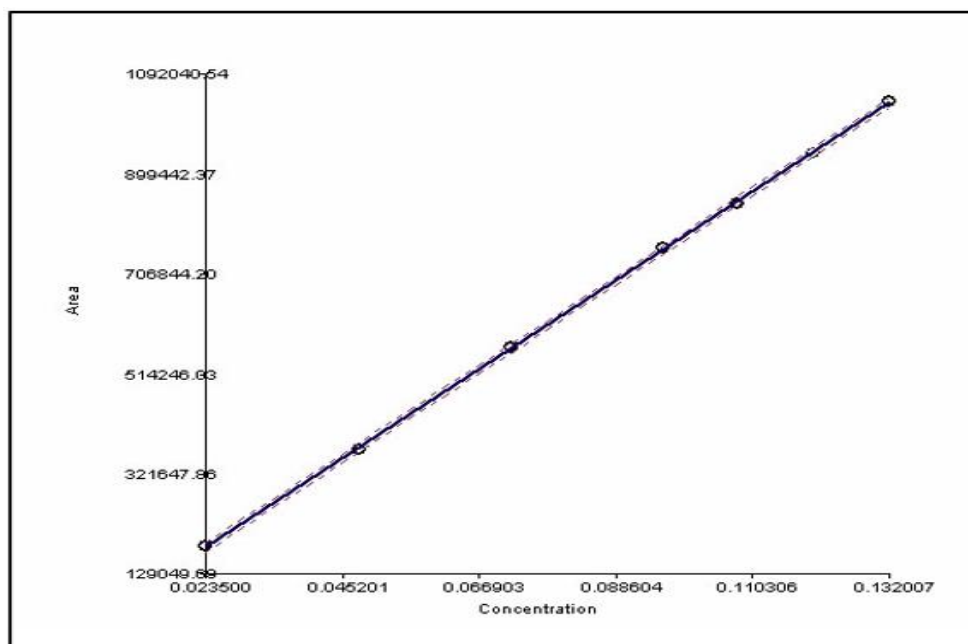


Figura 3.36. Curva de calibração da linearidade de Lumefantrina – Dissolução

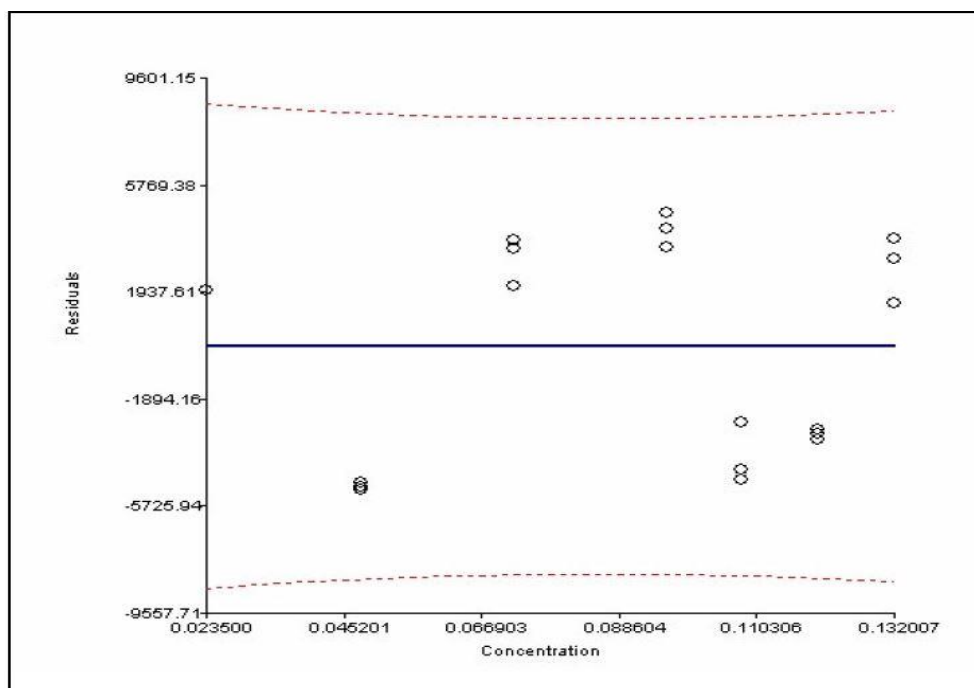


Figura 3.37. Distribuição de resíduos da linearidade de Lumefantrina – Dissolução

Tabela 3.35. Análise de variância da linearidade de Lumefantrina – Dissolução

Nível de Confiança	97,50
<i>t Student</i>	2,093
Y intercepção	-4,04e+3
Declive	7,89e+6
Coefficiente de correlação (<i>r</i>)	0,999
Coefficiente de determinação (<i>r</i> ²)	0,999
Variância consoante a regressão (<i>ST</i> ²)	1,76e+12
Variância residual (<i>SR</i> ²)	1,47e+7
Somatório dos quadrados residual	2,80e+8

Tabela 3.36. Testes estatísticos da linearidade de Lumefantrina - Dissolução

Testes de Correlação de Fisher	
Nível de confiança	97,50
Graus de Liberdade (1, 2)	1, 19
<i>F</i> tabelado	4,380
<i>F</i> calculado	1,193e+3
Compatibilidade entre Y intercepção e o valor 0	
Nível de confiança	97,50
Graus de Liberdade	19
<i>t</i> tabelado	2,093
<i>t</i> calculado	1,900

3.2.2.2.3. Conclusão

Concluiu-se que o método é linear para a Lumefantrina na gama de concentrações estudada, pois existe correlação entre os valores de concentração e os sinais obtidos do sistema cromatográfico, os testes estatísticos realizados são válidos e o coeficiente de correlação está segundo os critérios de aceitação.

3.2.2.3. Exatidão sobre o intervalo da linearidade

3.2.2.3.1. Critérios de aceitação

- A percentagem de recuperação deve ser entre os 80% - 110%
- Intervalo de confiança de 97.5%

3.2.2.3.2. Resultados

O ensaio inicial da exatidão da dissolução Lumefantrina teve que ser repetido, dado que se detetou que o ativo estava presente numa concentração muito inferior à que seria esperada quando comparada com a linearidade, como se observa no cromatograma da figura 3.38. Assim, repetiu-se o ensaio de maneira ligeiramente diferente, pois podia tratar-se da baixa solubilidade do ativo no meio de dissolução usado ou da densidade do ativo ser inferior à do meio de dissolução, o que dificultaria a mistura e, consequentemente, a dissolução.

Ao invés de se colocar a matriz diretamente no copo de dissolução, dissolveu-se a matriz num balão volumétrico de 100mL com meio de dissolução, que posteriormente foi adicionado ao copo de dissolução com 900mL de meio de dissolução. Obtiveram-se o cromatograma da figura 3.39 e os resultados apresentados nas tabelas 3.37, 3.38 e 3.39.

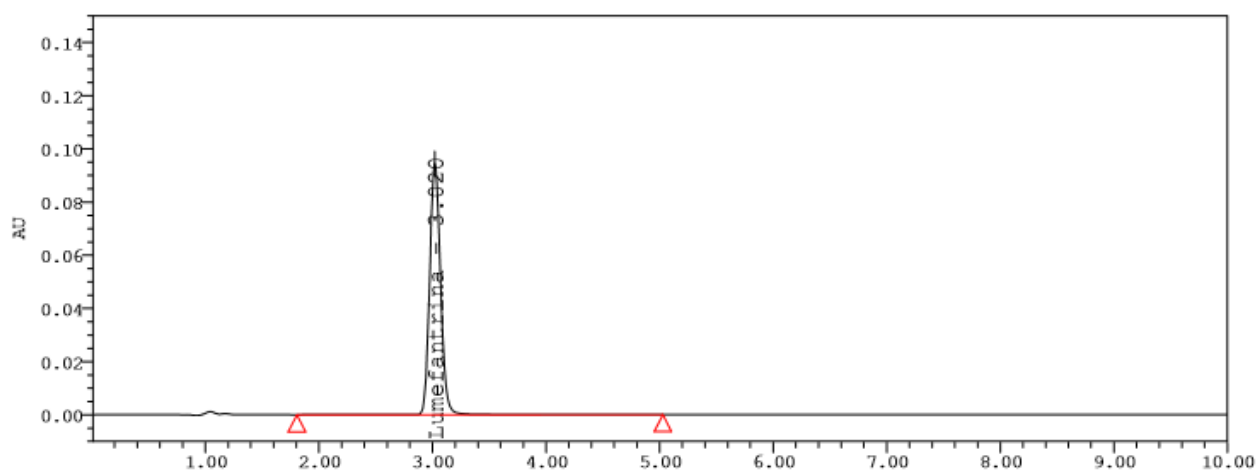


Figura 3.38. Cromatograma matriz 100% no 1º ensaio da linearidade de Lumefantrina com uma área de 635524 mAU.s – Dissolução

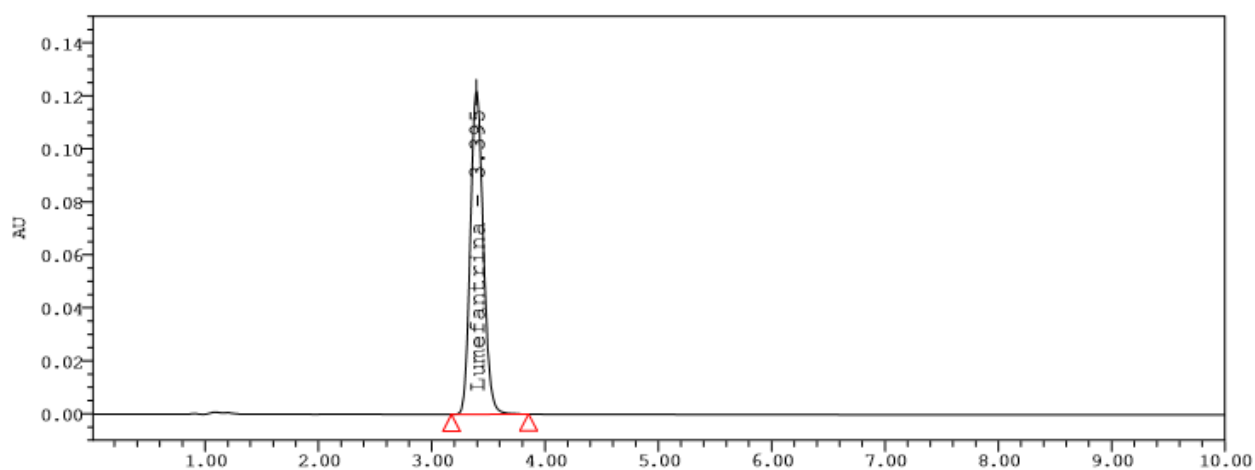


Figura 3.39. Cromatograma matriz 100% no 2º ensaio da linearidade de Lumefantrina com uma área de 968146 mAU.s – Dissolução

Tabela 3.37. Concentração, Áreas e Recuperação média da exatidão de Lumefantrina - Dissolução

Concentração (mg/mL)	Área (mAU.s)	Recuperação Média (%)
0,072	582984,00	102,60
	586348,00	
	582688,00	
0,096	786737,00	103,71
	780707,00	
	780410,00	
0,120	968146,00	102.62
	970918,00	
	971174,00	

De acordo com a equação da reta da linearidade $y=mx+b$ obtiveram-se os gráficos apresentados nas figuras 3.40 e 3.41.

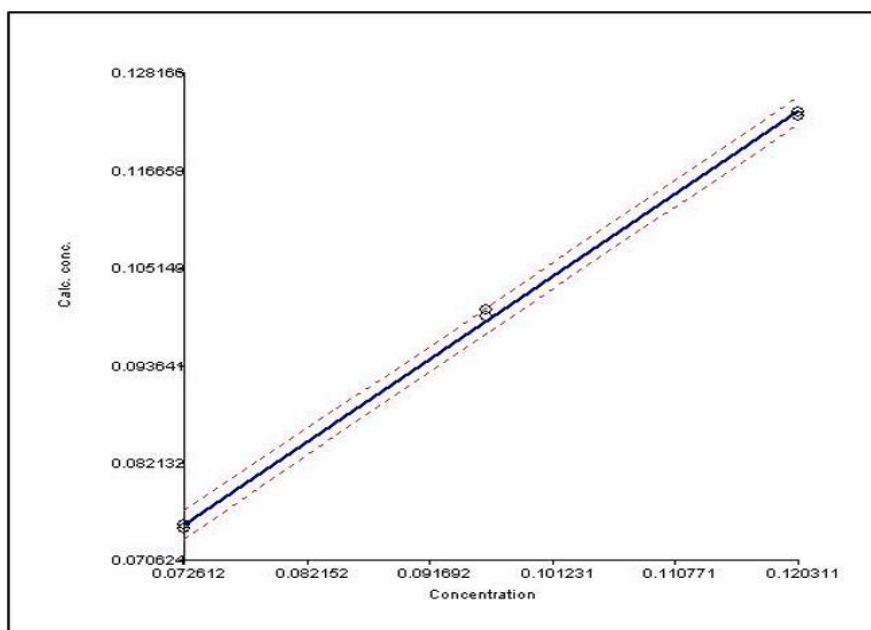


Figura 3.40. Curva de calibração da exatidão de Lumefantrina – Dissolução

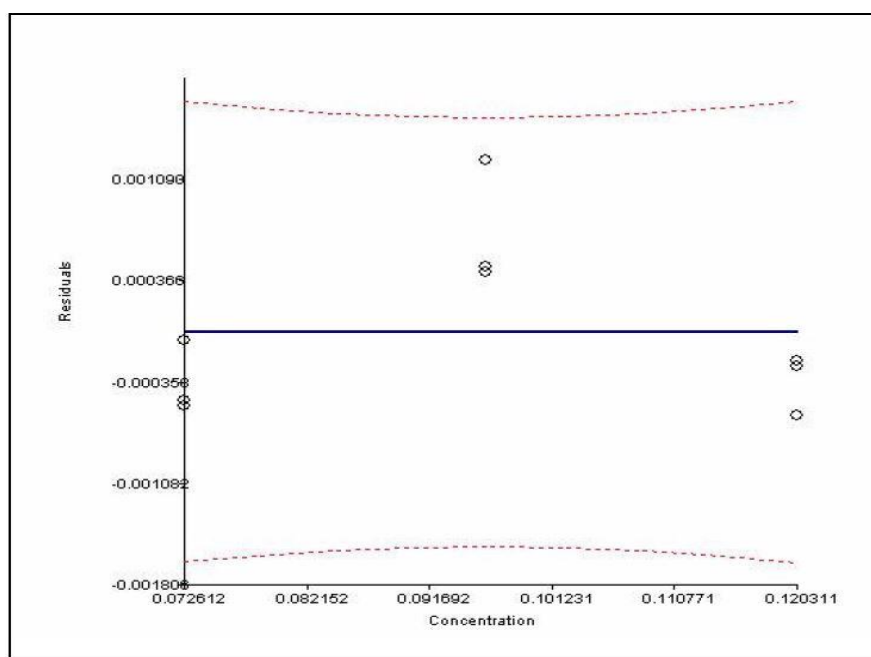


Figura 3.41. Distribuição de resíduos da exatidão de Lumefantrina – Dissolução

Tabela 3.38. Análise de variância da exatidão de Lumefantrina - Dissolução

Nível de Confiança	97,50
<i>t Student</i>	2,365
Y interceção	4,17e-4
Declive	1,03
Coefficiente de correlação (<i>r</i>)	0,999
Coefficiente de determinação (<i>r</i> ²)	0,999
Variância consoante a regressão (<i>ST</i> ²)	3,59e-3
Variância residual (<i>SR</i> ²)	4,12e-7
Somatório dos quadrados residual	2,88e-6

Tabela 3.39. Testes estatísticos da exatidão de Lumefantrina – Dissolução

Teste de Correlação de Fisher	
Nível de confiança	97,50
Graus de Liberdade (1, 2)	1, 7
<i>F</i> tabelado	8,070
<i>F</i> calculado	8713,356
Compatibilidade entre o declive e o valor 1	
Nível de confiança	97,50
Graus de Liberdade	7
<i>t</i> tabelado	2,365
<i>t</i> calculado	2,313
Compatibilidade entre Y interceção e o valor 0	
Nível de confiança	97,50
Graus de Liberdade	7
<i>t</i> tabelado	2,365
<i>t</i> calculado	0,386

3.2.2.3.3. Conclusão

Segundo os resultados obtidos, as taxas de recuperação média para todas as concentrações estão dentro do intervalo descrito nos critérios de aceitação para a exatidão do método de dissolução da Lumefantrina, e os testes estatísticos realizados foram satisfatórios.

3.2.2.4. Precisão do Sistema

3.2.2.4.1. Critérios de aceitação

Desvio padrão relativo (RSD) inferior ou igual a 2%.

3.2.2.4.2. Resultados

Na tabela 3.40, estão apresentados os resultados obtidos para a Repetibilidade do Sistema do ensaio de Dissolução.

Tabela 3.40. Resultados da Repetibilidade do Sistema para Lumefantrina - Dissolução

Injeção	Área de Padrão (mAU.s)
1	950717,00
2	942747,00
3	943126,00
4	944173,00
5	943555,00
6	943168,00
Média	944581,00
%RSD	0,32

3.2.2.4.3. Conclusão

Os resultados obtidos para a Repetibilidade do Sistema cumprem os critérios de aceitação estabelecidos.

3.2.2.5. Precisão

3.2.2.5.1. Critérios de aceitação

- Coeficiente de variação de repetibilidade ($n=6$) $\leq 3\%$
- Coeficiente de variação de precisão intermédia ($n=18$) $\leq 4\%$

3.2.2.5.2. Resultados

De modo a saber a concentração obtida em cada amostra, foi feita uma calibração para cada grupo da precisão com seis injeções de padrão, usando a concentração real do padrão. Na tabela 3.41 estão os dados obtidos através do sistema cromatográfico para os três grupos da precisão, e na tabela 3.42 apresentam-se os testes estatísticos aplicados ao ensaio da precisão.

Tabela 3.41. Concentração das soluções e Áreas obtidas da Precisão de Lumefantrina - Dissolução

Grupo	Concentração Amostra (mg/mL)	Área da Amostra (mAU.s)
1	0.120	86208 5
	0.120	84990 1
	0.120	85089 4
	0.120	85139 6
	0.120	85015 1
	0.120	85017 4
2	0.120	87421 7
	0.120	87234 6
	0.120	86745 1
	0.120	86809 4
	0.120	87038 7
	0.120	86795 8
3	0.121	85224 8
	0.121	85441 1
	0.121	84468 7
	0.121	85336 0
	0.121	84824 5
	0.121	84834 7

Tabela 3.42. Análise de variância da precisão de Lumefantrina - Dissolução

Nível de Confiança	97,50
Graus de liberdade	17
t tabelado	2,110
Área Média das Amostras	857575
Intervalo de variação (%)	0,66
Variância da repetibilidade (Sr^2)	1,47e+7
Variância da precisão intermédia (SR^2)	1,31e+8
Coefficiente de variação de repetibilidade	0,45
Coefficiente de variação de precisão intermédia	1,33

3.2.2.5.3. Conclusão

Os resultados obtidos dos testes estatísticos aplicados ao ensaio da precisão são satisfatórios e cumprem os critérios de aceitação.

3.2.2.6. Robustez

3.2.2.6.1. Critérios de aceitação

Desvio em relação a resposta inicial inferior a 2.0 % ($G_n - G_1 \leq \pm 2.0\%$).

3.2.2.6.2. Resultados

Na tabela 3.43, apresentam-se as diferentes alterações aplicadas ao método da dissolução. Como exemplo, apresentam-se nas figuras 3.42 e 3.43 dois dos cromatogramas obtidos do ensaio de robustez.

Tabela 3.43. Resultados de robustez para Lumefantrina – Dissolução

G	Modificações	RSD do Padrão (%)	Tempo Retenção (min)	Dissolução (%)	G_n-G₁ (%)
1	S/ Modificação	0,089	3,026	91,20	–
2	Temperatura 30°C	0,611	2,845	91,70	0,50
3	Fluxo 0,8mL/min	0,120	3,642	91,90	0,70
4	Fluxo 1,2mL/min	0,103	2,468	91,30	0,10
5	Tampão pH 2.3/ ACN (30:70)	0,041	3,026	90,90	-0,30
6	Tampão pH 2.3/ ACN (20:80)	0,650	2,384	92,40	1,20
7	Tampão pH 2.1/ ACN (40:60)	0,152	2,674	90,80	-0,40
8	Tampão pH 2.5/ ACN (40:60)	0,370	2,913	92,00	0,70
9	Filtros papel 41	0,199	3,033	92,50	1,30
10	Filtros GF/C	0,059	3,037	91,40	0,20

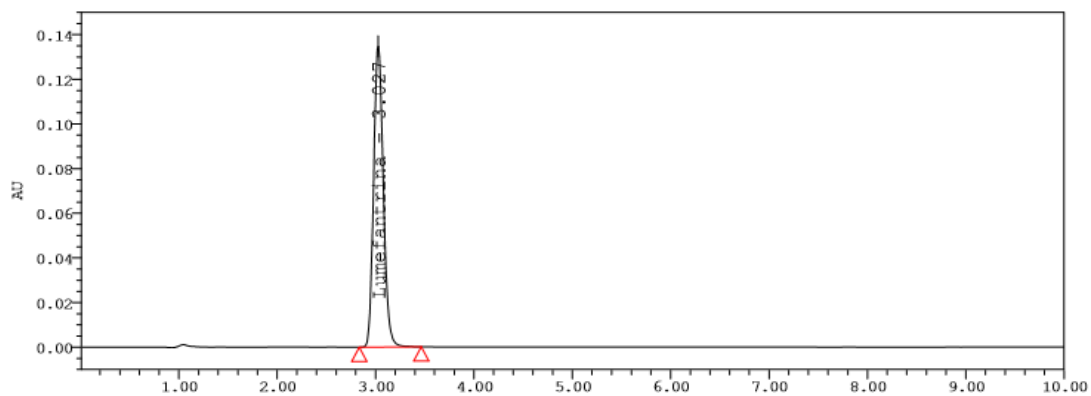


Figura 3.42. Cromatograma Grupo 1 da Robustez de Lumefantrina – Dissolução

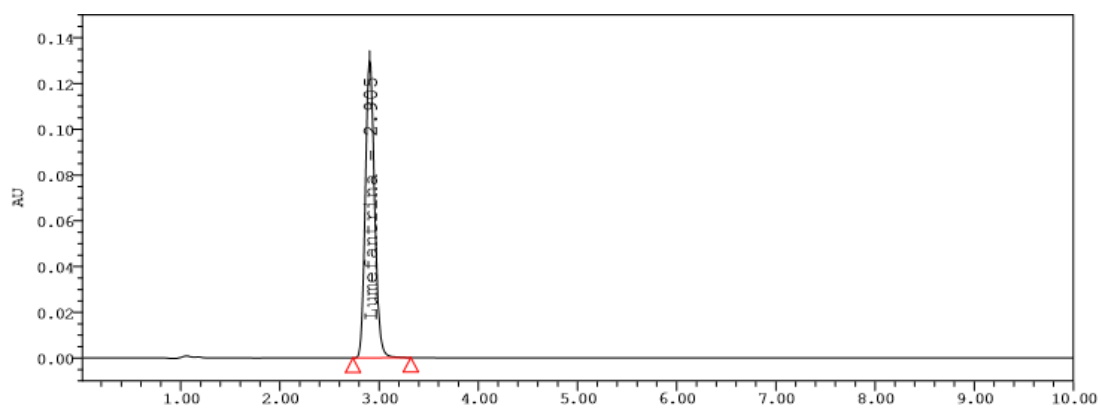


Figura 3.43. Cromatograma Grupo 8 da Robustez de Lumefantrina – Dissolução

3.2.2.6.3. Conclusão

Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que o método da dissolução é robusto para todos os grupos testados, cumprindo os critérios de aceitação.

3.2.2.7. Estabilidade

3.2.2.7.1. Critérios de aceitação

Os resultados da dissolução dos vários tempos testados não devem diferir mais de $\pm 5.0\%$ do resultado obtido com o tempo 0 horas

O último valor da dissolução dentro do intervalo especificado ($\pm 5\%$) para as amostras e/ou padrão de verificação, determina o tempo de estabilidade da solução

3.2.2.7.2. Resultados

Na tabela 3.44, podem ler-se os resultados obtidos do ensaio de estabilidade das soluções.

Tabela 3.44. Resultados de estabilidade para Lumefantrina - Dissolução

Tempo (hora)	RSD do Padrão (%)	Área Média Padrão (mAU.s)	Área Média Amostra (mAU.s)	Dissolução (%)	Gn-G1 (%)
0	0,09	926533,83	847802,67	91,22	—
10	0,06	929089,83	850672,33	91,28	0,1
20	0,04	924300,00	845404,00	91,19	0,0
30	0,04	927703,50	854351,33	91,81	0,6

3.2.2.7.3. Conclusão

Os resultados obtidos do ensaio de estabilidade das soluções indicam, seguindo os critérios de aceitação, que estas são estáveis pelo menos até 30 horas.

3.3. Substâncias Aparentadas

3.3.1. Substâncias Aparentadas de Arteméter

3.3.1.1. Especificidade

3.3.1.1.1. Critérios de aceitação

- Não devem aparecer picos a interferir com o pico de ativo.

3.3.1.1.2. Resultados

De seguida, encontram-se os cromatogramas obtidos (da figura 3.44 à 3.48), correspondentes às injeções feitas no sistema cromatográfico para o ensaio da especificidade.

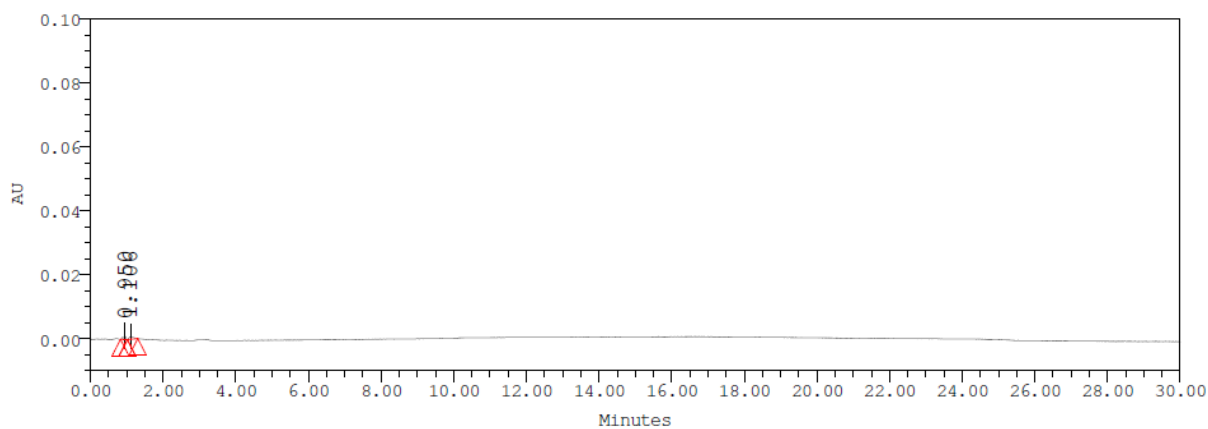


Figura 3.44. Cromatograma solvente de Arteméter - Substâncias Aparentadas

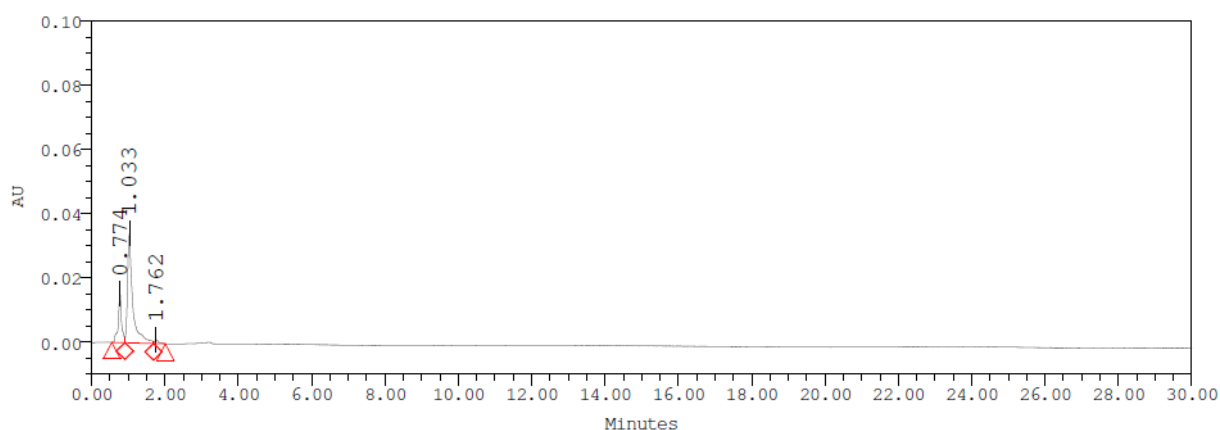


Figura 3.45. Cromatograma placebo de Arteméter – Substâncias Aparentadas

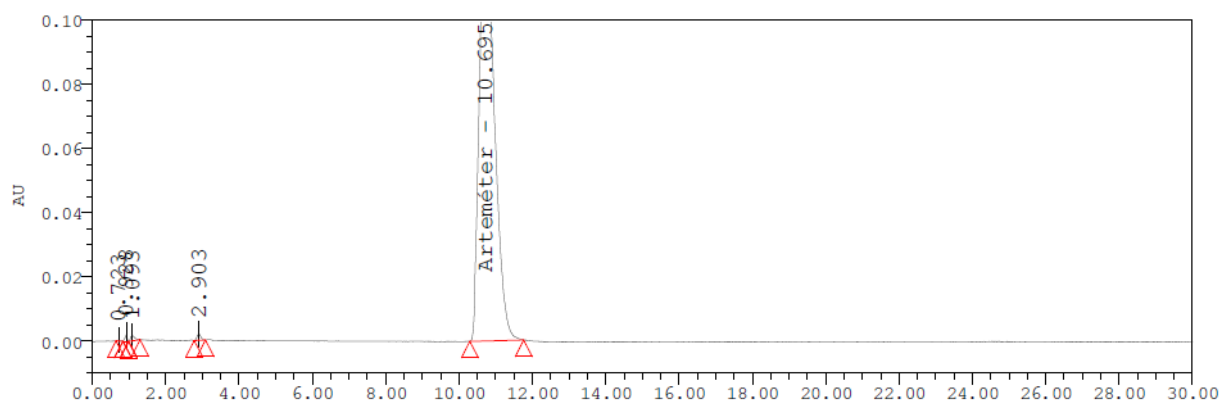


Figura 3.46. Cromatograma padrão 100% de Arteméter – Substâncias Aparentadas

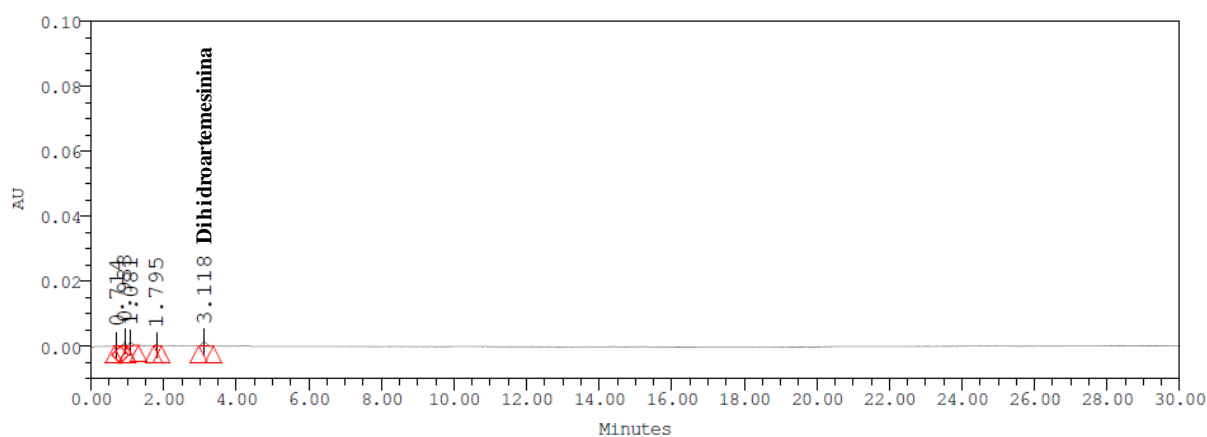


Figura 3.47. Cromatograma padrão de dihidroartemesinina – Substâncias Aparentadas

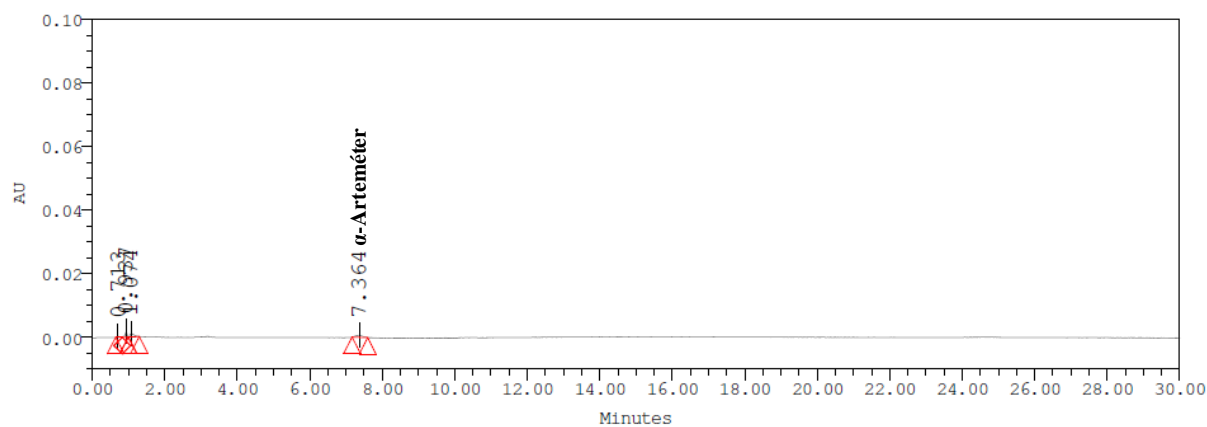


Figura 3.48. Cromatograma de α-arteméter

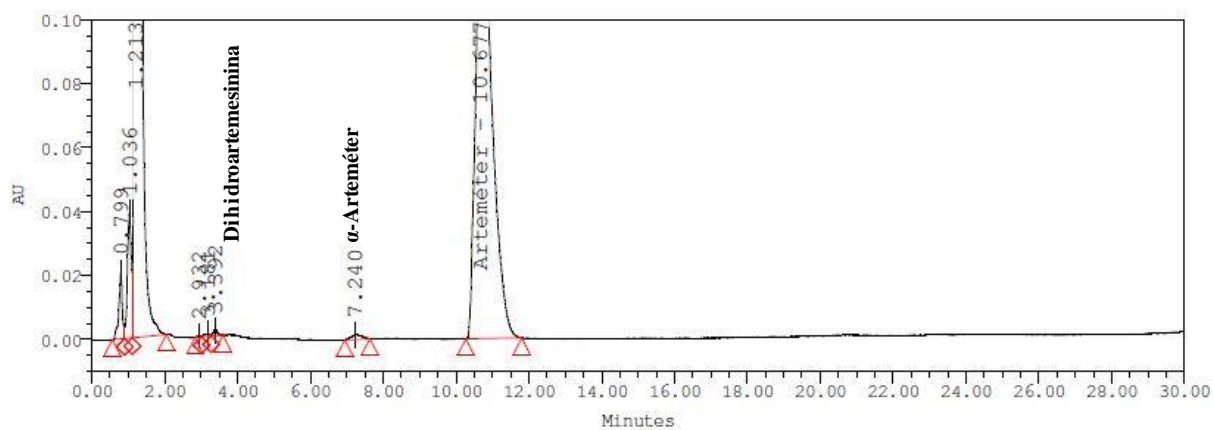


Figura 3.49. Cromatograma matriz de Arteméter – Substâncias Aparentadas

3.3.1.1.3. Conclusão

Pela análise dos cromatogramas das soluções injetadas, concluiu-se que não há interferências entre os picos.

3.3.1.2. Testes de Stress

3.3.1.2.1. Resultados

Na tabela 3.45 estão os resultados dos testes de stress de arteméter, seguida dos cromatogramas obtidos das injeções dessas soluções e da tabela 3.46 onde estão descritos os resultados de pureza obtidos dos testes de stress e da análise dos cromatogramas (da figura 3.50 à 3.57).

Tabela 3.45. Resultados de testes de stress de Arteméter – Substâncias Aparentadas

TESTES DE STRESS					
Testes		Identificação dos picos (T. de Retenção) (min)			Área de Arteméter
		Dihidroartemesinina	α -arteméter	Arteméter	(mAU.s)
S/ataque_T0		3,197	N.D	10,661	3594823
S/ataque_T24		3,206	N.D	10,807	3591290
HCL_T0		3,109	8,895	10,899	632560
HCL_T24		3,113	8,957	11,051	381275
NaOH_T0		3,369	N.D	10,574	5502254
NaOH_T24		3,397	N.D	10,687	5527914
Peróxido_T0		N.D	N.D	10,618	5091756
Peróxido_T24		3,176	N.D	10,71	5097466
Calor_T0	24h	3,181	7,24	10,677	4513538
	48h	3,179	6,736	10,626	4717133
	5dias	3,199	6,759	10,609	4895861
Luz_T0	24h	3,193	N.D	10,595	5146903
	48h	3,183	N.D	10,62	4714325
	5dias	N.D	7,303	10,613	4830204
Calor_T24	24h	3,224	7,305	10,764	4510294
	48h	3,212	6,751	10,749	4809396
	5dias	3,205	6,766	10,712	4992744
Luz_T24	24h	3,194	N.D	10,695	525227
	48h	N.D	N.D	10,721	4837167
	5dias	N.D	6,766	10,723	4949621

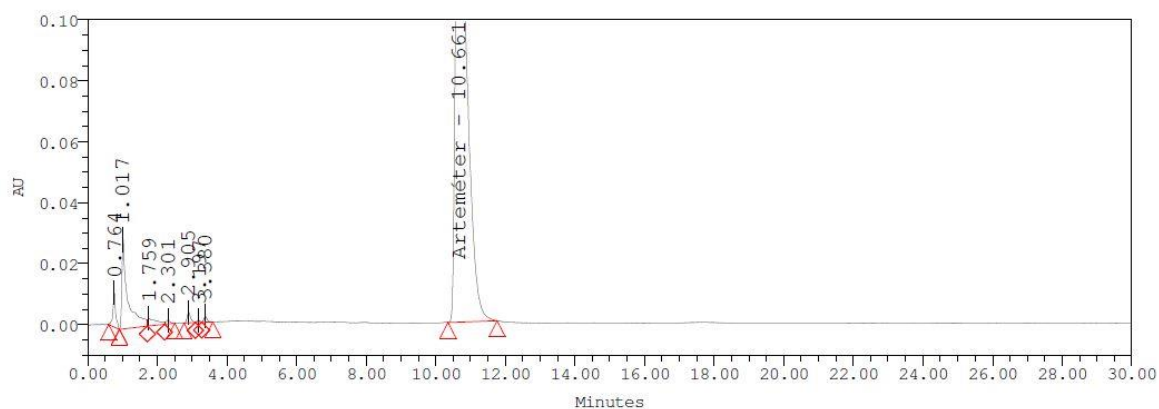


Figura 3.50. Cromatograma s/ataque t_0 de Arteméter – Substâncias Aparentadas

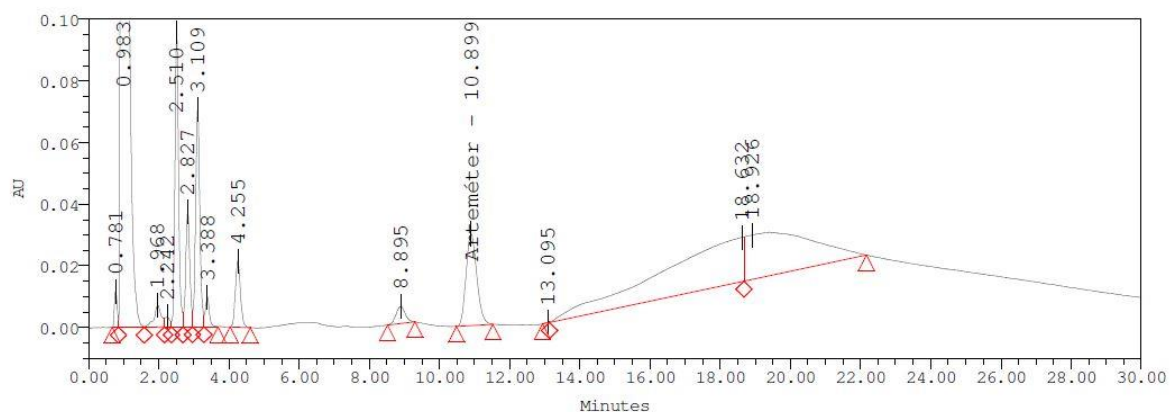


Figura 3.51. Cromatograma stress ácido t_0 de Arteméter – Substâncias Aparentadas

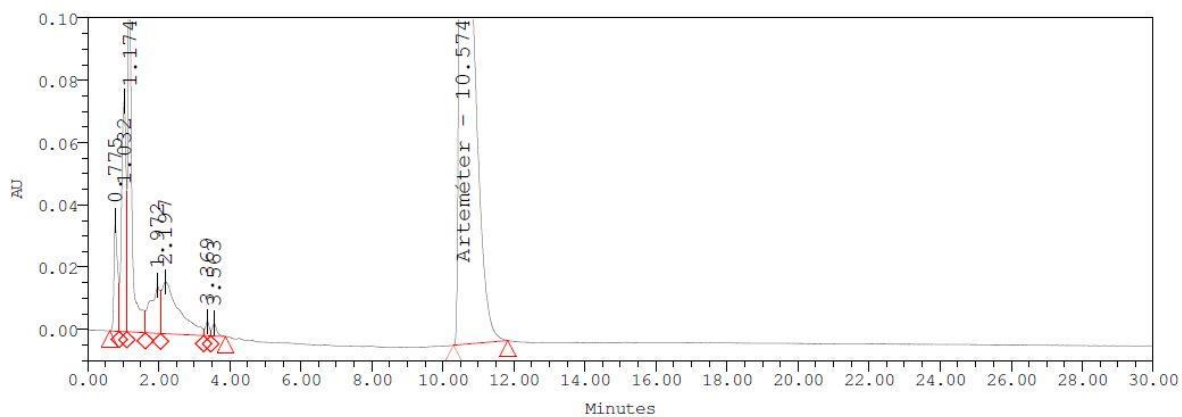


Figura 3.52. Cromatograma stress básico t_0 de Arteméter – Substâncias Aparentadas

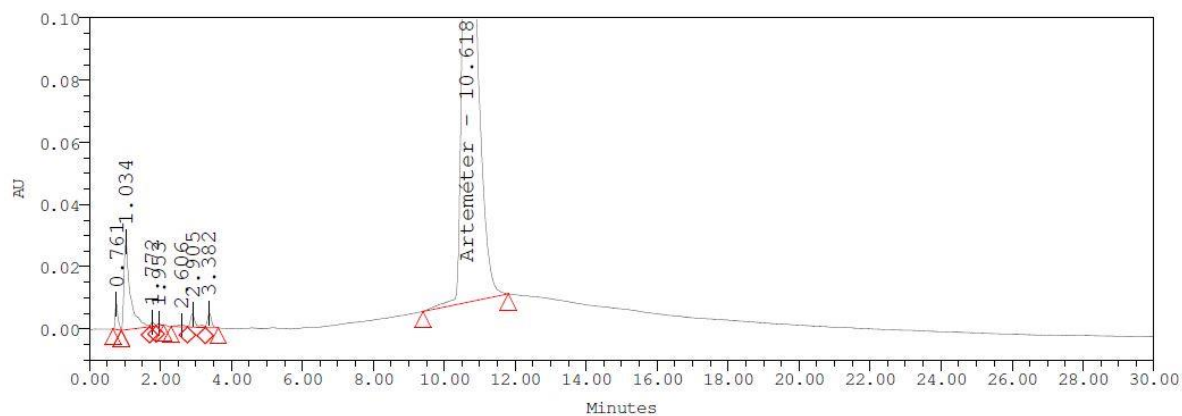


Figura 3.53. Cromatograma stress oxidação t_0 de Arteméter – Substâncias Aparentadas

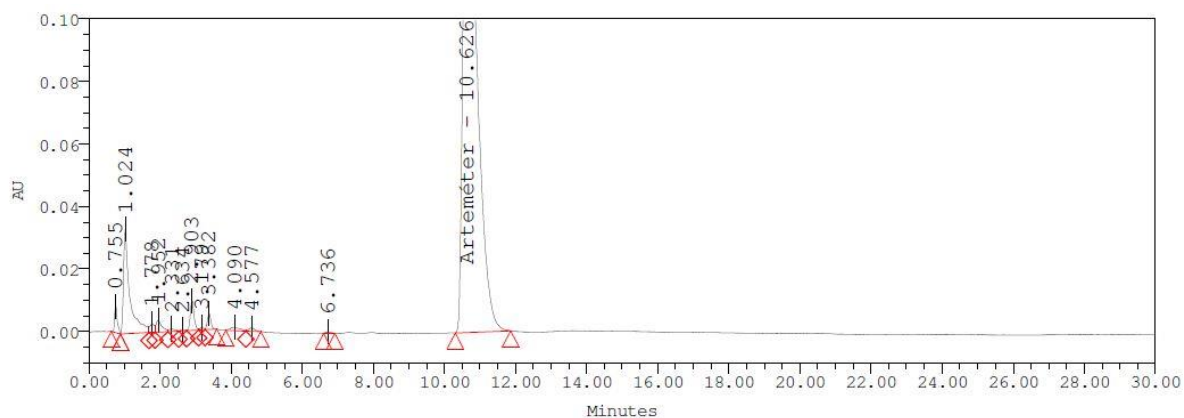


Figura 3.54. Cromatograma stress calor 48 horas t_0 de Arteméter – Substâncias Aparentadas

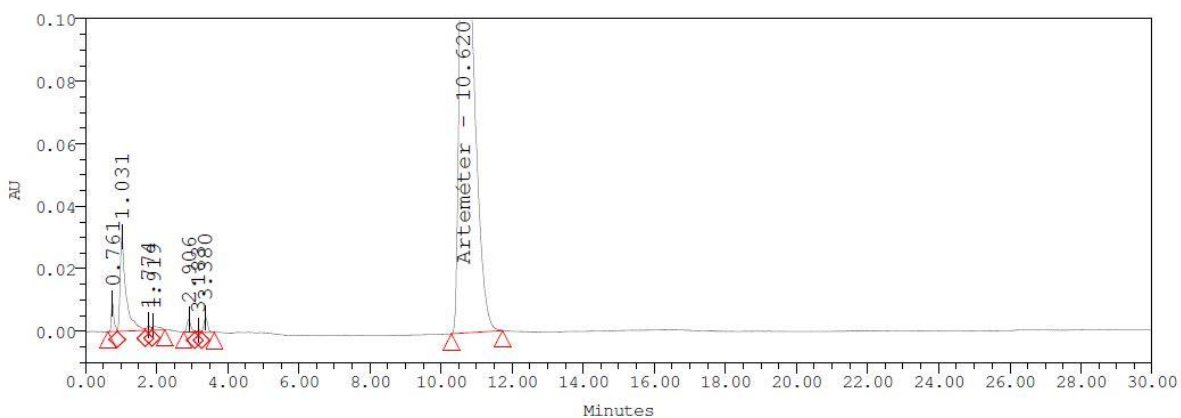


Figura 3.55. Cromatograma stress luz 48 horas t_0 de Arteméter – Substâncias Aparentadas

Tabela 3.46. Resultados de pureza obtidos dos testes de stress de Arteméter – Substâncias Aparentadas

Amostras		Angulo de Pureza (AP)	Limite de Pureza (LP)	Análise de Pureza AP<LP
HCL_T0		1,22	13,97	Puro
HCL_T24		2,47	27,17	Puro
NaOH_T0		0,56	5,52	Puro
NaOH_T24		0,31	5,18	Puro
Peróxido_T0		7,11	3,6	Impuro
Peróxido_T24		4,32	3,63	Impuro
Calor_T0	24h	0,31	3,95	Puro
	48h	0,25	3,84	Puro
	5dias	0,32	3,62	Puro
Luz_T0	24h	0,26	3,62	Puro
	48h	0,3	3,88	Puro
	5dias	0,36	3,83	Puro
Calor_T24	24h	0,25	3,98	Puro
	48h	0,21	3,87	Puro
	5dias	0,27	3,59	Puro
Luz_T24	24h	0,29	3,53	Puro
	48h	0,25	3,94	Puro
	5dias	0,25	3,9	Puro

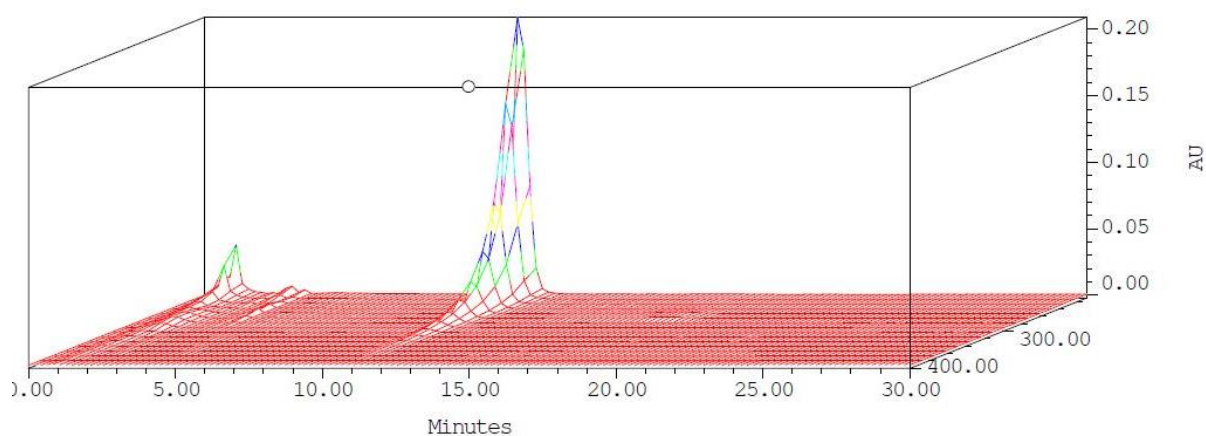


Figura 3.56. Cromatograma 3D s/ataque t_0 de Arteméter – Substâncias Aparentadas

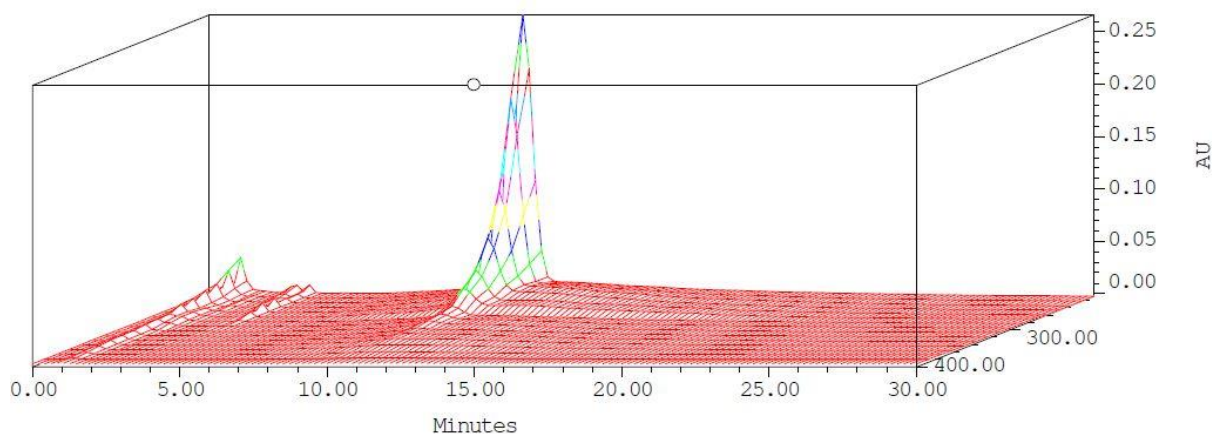


Figura 3.57. Cromatograma 3D stress oxidação t_0 de Arteméter – Substâncias Aparentadas

3.3.1.2.2. Conclusão

Os resultados obtidos nos testes de *stress* indicaram que, em comparação com a amostra sem ataque, o ativo degradou-se em contacto com o meio ácido, provocando uma hidrólise ácida e decompondo o pico de ativo (área diminui) em degradações não visíveis no sistema cromatográfico.

Em todas as outras condições, a área de ativo aumentou consideravelmente. Isto deve-se à formação de compostos com estrutura similar ao Arteméter que, aquando da análise de pureza do pico, não são detetáveis. Os resultados de pureza obtidos, indicaram que em todas as condições de *stress* os picos de ativo são puros.

No ensaio de oxidação (H_2O_2), obteve-se o valor de ângulo de pureza superior ao limite de pureza, o que significa que o pico de ativo não é puro, existindo contaminantes no mesmo comprimento de onda.

3.3.1.3. Linearidade

3.3.1.3.1. Critérios de aceitação

- O coeficiente de correlação, $r \geq 0.995$
- Correlação entre a concentração do ativo e os sinais obtido ($F_{\text{calculado}} \geq F_{\text{tabelado}}$)
- Compatibilidade do valor de Y- interceção com o valor 0 ($t_{\text{calculado}} \leq t_{\text{tabelado}}$)

3.3.1.3.2. Resultados

Na tabela 3.47 estão os resultados obtidos do sistema cromatográfico e introduzidos no *software Validation Manager 3*:

Tabela 3.47. Concentração das soluções e Áreas obtidas da linearidade de Arteméter – Substâncias Aparentadas

Concentração (mg/mL)	Área (mAU.s)
0,005	2428
	1312
	3257
0,010	4060
	3603
	3439
0,020	9851
	8685
	8891
0,030	10640
	10976
	11614
0,050	20484
	18192
	19989
0,100	37142
	41161
	36919
0,150	61389
	57908
	59386

De acordo com a equação da reta da linearidade $y=mx+b$ obtiveram-se os gráficos apresentados nas figuras 3.58 e 3.59 e os testes estatísticos nas tabelas 3.48 e 3.49.

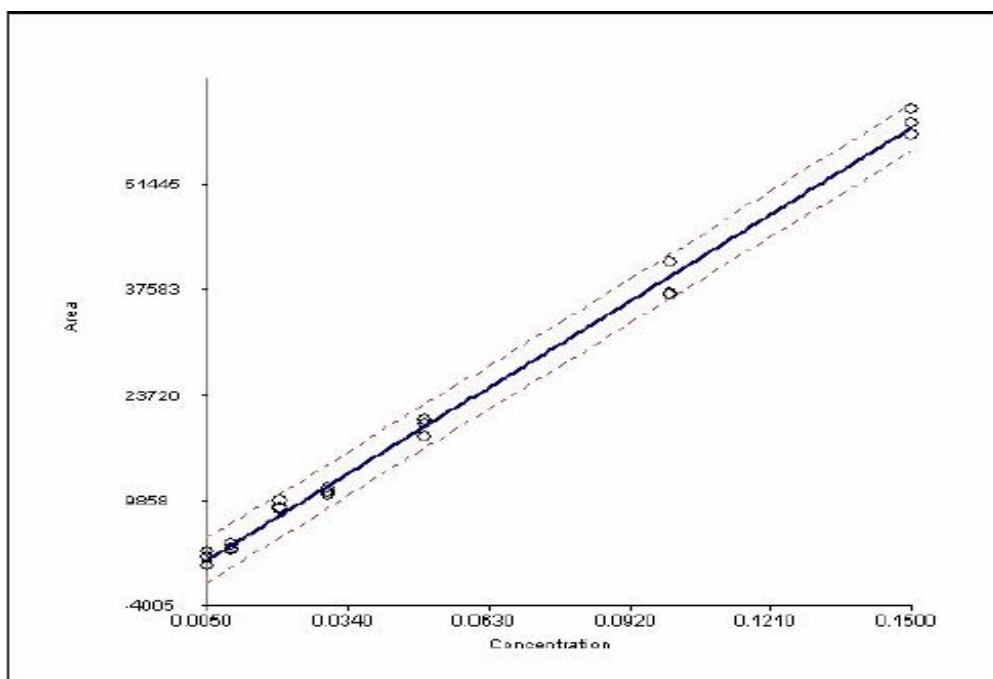


Figura 3.58. Curva de calibração da linearidade de Arteméter – Substâncias Aparentadas

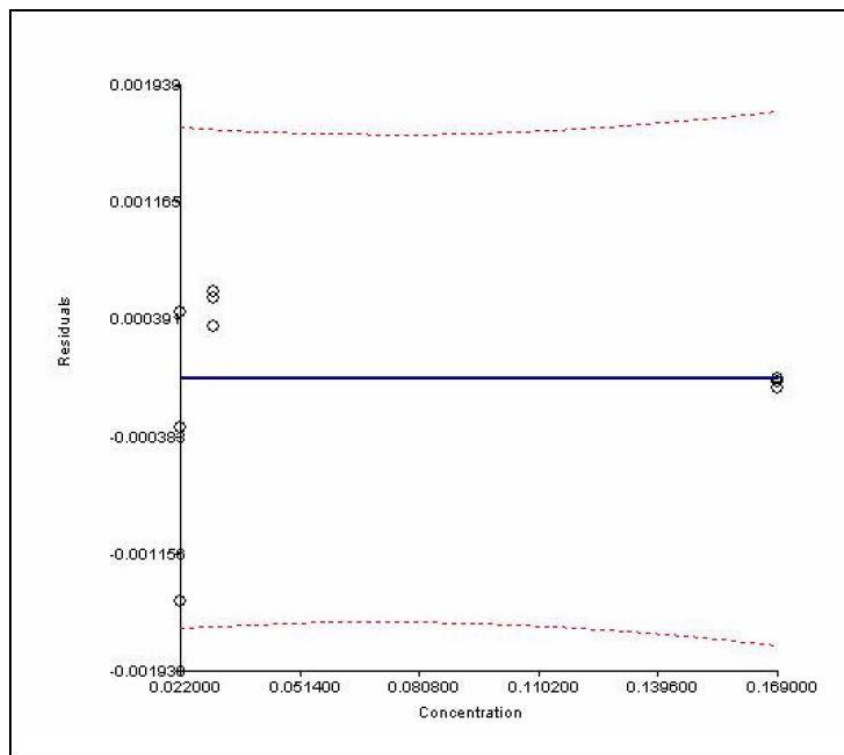


Figura 3.59. Distribuição de resíduos da linearidade de Arteméter – Substâncias Aparentadas

Tabela 3.48. Análise de Variância da Linearidade de Arteméter – Substâncias Aparentadas

Nível de Confiança	97,500
<i>t Student</i>	2,093
Y intercepção	94,456
Declive	3,921e+5
Coefficiente de correlação (<i>r</i>)	0,998
Coefficiente de determinação (<i>r</i> ²)	0,996
Variância consoante a regressão (<i>SR</i> ²)	8,022e+9
Variância residual (<i>SR</i> ²)	1,803e+6
Somatório dos quadrados residual	3,426e+7

Tabela 3.49. Análises estatísticas da linearidade de Arteméter – Substâncias Aparentadas

Teste de Correlação de Fisher	
Nível de confiança	97,50
Graus de Liberdade	1, 19
<i>F</i> tabelado	5,920
<i>F</i> calculado	4448,815
Compatibilidade entre Y intercepção e o valor 0	
Nível de confiança	97,50
Graus de Liberdade	19
<i>t</i> tabelado	2,093
<i>t</i> calculado	0,223

3.3.1.3.3. Conclusão

Concluiu-se que o método é linear para o Arteméter na gama de concentrações estudada, pois existe correlação entre os valores de concentração e os sinais obtidos do sistema cromatográfico, os testes estatísticos realizados são válidos e o coeficiente de correlação está segundo os critérios de aceitação.

3.3.1.4. Exatidão sobre o intervalo da linearidade

3.3.1.4.1. Critérios de aceitação

- A percentagem de recuperação deve ser entre os 80% - 110% para todos os níveis de concentração.
- Intervalo de confiança de 97,5%

3.3.1.4.2. Resultados

Na tabela 3.50 estão os resultados obtidos do sistema cromatográfico e introduzidos no *software Validation Manager 3*:

Tabela 3.50. Recuperação média da exatidão de Arteméter – Substâncias Aparentadas

Concentração (mg/mL)	Área (mAU.s)	Recuperação Média (%)
0,022	8134	97,82
	8583	
	8879	
0,030	12186	101,61
	12112	
	12202	
0,017	66605	100,39
	66622	
	66627	

De acordo com a equação da reta da linearidade $y=mx+b$ obtiveram-se os gráficos apresentados nas figuras 3.60 e 3.61 e os testes estatísticos nas tabelas 3.51 e 3.52.

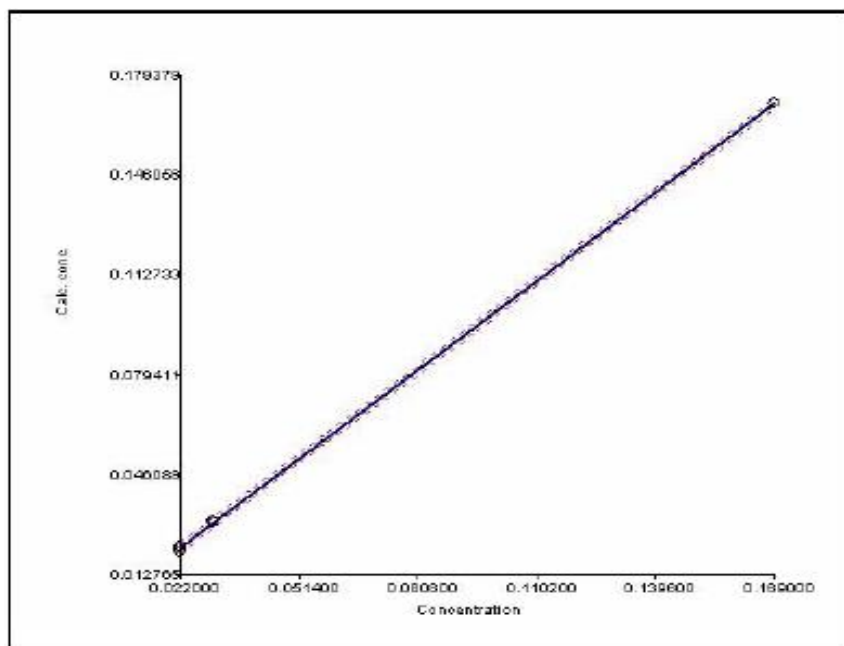


Figura 3.60. Curva de calibração da exatidão de Arteméter – Substâncias Aparentadas

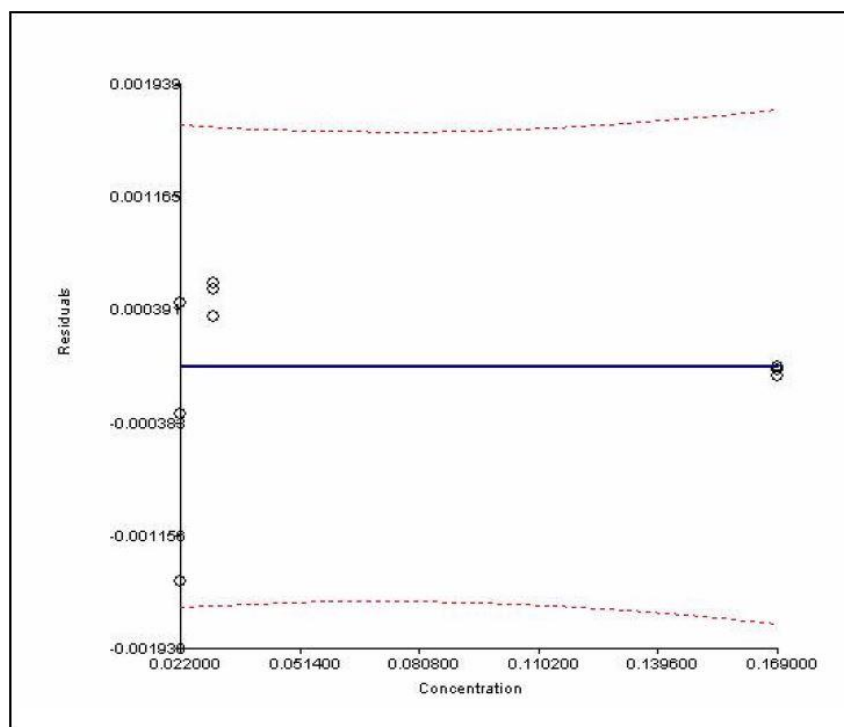


Figura 3.61. Distribuição de resíduos da exatidão de Arteméter – Substâncias Aparentadas

Tabela 3.51. Análise de variância da exatidão de Arteméter – Substâncias Aparentadas

Nível de Confiança	97,50
<i>t Student</i>	2,365
Y interceção	-1,38e-4
Declive	1,01
Coefficiente de correlação (<i>r</i>)	0,999
Coefficiente de determinação (<i>r</i> ²)	0,999
Variância consoante a regressão (<i>S</i> ²)	4,13e-2
Variância residual (<i>S</i> ²)	4,52e-7
Somatório dos quadrados residual	3,10e-6

Tabela 3.52. Testes estatísticos da exatidão de Arteméter – Substâncias Aparentadas

Teste de Correlação de Fisher	
Nível de confiança	97,50
Graus de Liberdade (1, 2)	1, 7
<i>F</i> tabelado	8,070
<i>F</i> calculado	9,150e+4
Compatibilidade entre o declive e o valor 1	
Nível de confiança	97,50
Graus de Liberdade	7
<i>t</i> tabelado	2,365
<i>t</i> calculado	1,474
Compatibilidade entre Y interceção e o valor 0	
Nível de confiança	97,50
Graus de Liberdade	7
<i>t</i> tabelado	2,365
<i>t</i> calculado	0,414

3.3.1.4.3. Conclusão

Segundo os resultados obtidos, as taxas de recuperação média para todas as concentrações estão dentro do intervalo descrito nos critérios de aceitação para a exatidão do método de dissolução de Arteméter, e os testes estatísticos realizados foram satisfatórios.

3.3.1.5. Precisão do Sistema

3.3.1.5.1. Critérios de aceitação

- Desvio padrão relativo (RSD) inferior ou igual a 5%.

3.3.1.5.2. Resultados

Na tabela 3.53, estão apresentados os resultados obtidos para a Repetibilidade do Sistema do ensaio de Substância Aparentadas.

Tabela 3.53. Resultados da Repetibilidade do Sistema para Arteméter – Substâncias Aparentadas

Injeção	Área de Padrão (mAU.s)
1	11722,00
2	11101,00
3	11507,00
4	10803,00
5	10811,00
6	10941,00
Média	11147,50
%RSD	3,44

3.3.1.5.3. Conclusão

Os resultados obtidos para a Repetibilidade do Sistema cumprem os critérios de aceitação estabelecidos.

3.3.1.6. Precisão

3.3.1.6.1. Critérios de aceitação

- Coeficiente de variação de repetibilidade ($n=6$) $\leq 5\%$
- Coeficiente de variação de precisão intermédia ($n=18$) $\leq 5\%$

3.3.1.6.2. Resultados

De modo a saber a concentração obtida em cada amostra, foi feita uma calibração para cada grupo da precisão com seis injeções de padrão, usando a concentração real do padrão. Na tabela 3.54 estão os dados obtidos através do sistema cromatográfico para os três grupos da precisão, e na tabela 3.55 apresentam-se os testes estatísticos aplicados ao ensaio da precisão.

Tabela 3.54. Áreas obtidas da por solução injetada na precisão de Arteméter – Substâncias Aparentadas

Grupo	Concentração Amostra (mg/mL)	Área da Amostra (mAU.s)
1	0,030	11894
	0,030	11594
	0,030	12509
	0,030	12518
	0,030	11687
	0,030	11361
2	0,030	12620
	0,030	12195
	0,030	12018
	0,030	12090
	0,030	11952
	0,030	13454
3	0,030	12434
	0,030	12623
	0,030	11784
	0,030	12578
	0,030	12011
	0,030	12384

Tabela 3.55. Análise de variância da precisão de Arteméter – Substâncias Aparentadas

Nível de Confiança	97,50
Graus de liberdade	17
t tabelado	2,110
Área Média das Amostras	12206
Intervalo de variação (%)	2,06
Variância da repetibilidade (Sr^2)	2,25e+5
Variância da precisão intermédia (SR^2)	2,56e+4
Coefficiente de variação de repetibilidade	3,89
Coefficiente de variação de precisão intermédia	4,14

3.3.1.6.3. Conclusão

Os resultados obtidos dos testes estatísticos aplicados ao ensaio da precisão são satisfatórios e cumprem os critérios de aceitação.

3.3.1.7. Limite de Quantificação

3.3.1.7.1. Critérios de aceitação

Desvio padrão relativo (%RSD) menor ou igual a 10,0%

3.3.1.7.2. Resultados

Os resultados obtidos encontram-se na tabela 3.56.

Tabela 3.56. Resultados do limite de quantificação de Arteméter – Substâncias Aparentadas

Injeção	Área do pico de ativo (mAU.s)
1	7983
2	9015
3	8820
4	7848
5	9091
6	7933
Média	8448.33
RSD(%)	6,93

3.3.1.7.3. Conclusão

Para a concentração 0,1% obteve-se um desvio padrão relativo dentro dos critérios de aceitação. Conclui-se que este é o limite de quantificação.

3.3.1.8. Robustez

3.3.1.8.1. Critérios de aceitação

- Desvio em relação a resposta inicial inferior a 2.0 % ($G_n - G_1 \leq \pm 2.0\%$)

3.3.1.8.2. Resultados

Na tabela 3.57, estão as diferentes alterações aplicadas ao método da dissolução assim como os resultados obtidos. Como exemplo, apresentam-se nas figuras 3.62 e 3.63 dois dos cromatogramas obtidos do ensaio de robustez.

Tabela 3.57. Resultados de robustez para Arteméter – Substâncias Aparentadas

G	Modificações	RSD do Padrão (%)	Tempo Retenção (min)	Dissolução (%)	Gn-G1 (%)
1	S/ Modificação	4,43	11,18	105,60	–
2	Tampão pH 2,3/ ACN (35:65)	2,49	8,45	104,50	-1,10
3	Fluxo 1,3mL/min	3,47	13,06	106,50	0,80
4	Fluxo 1,7mL/min	3,50	10,16	106,10	0,50

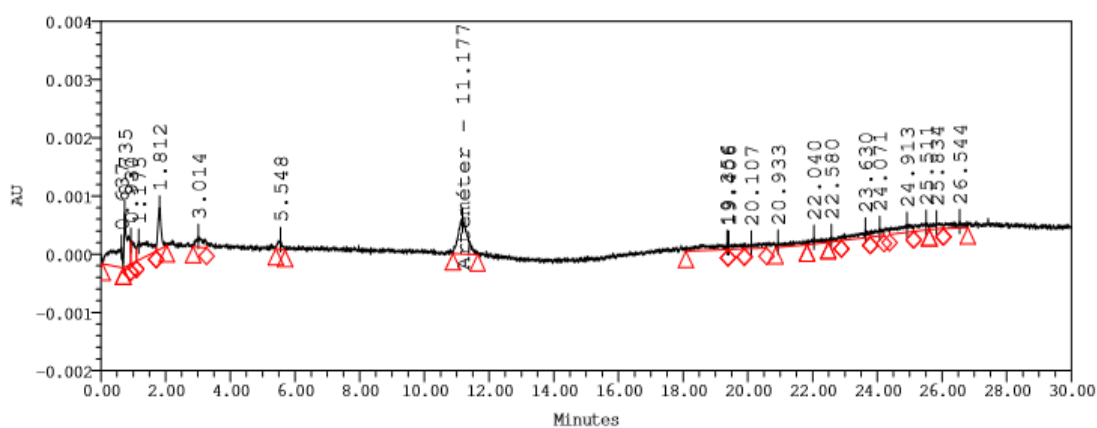


Figura 3.62. Cromatograma Grupo 1 da Robustez de Arteméter – Substâncias Aparentadas

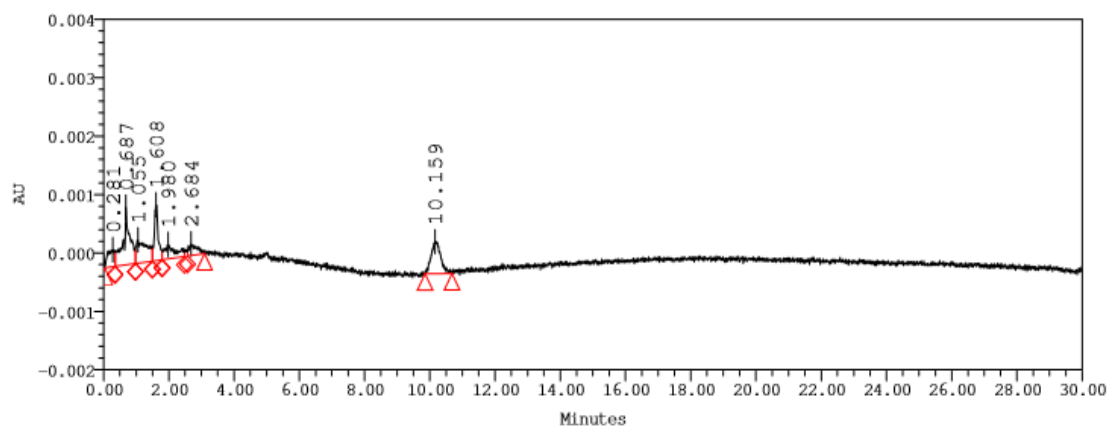


Figura 3.63. Cromatograma Grupo 4 da Robustez de Arteméter – Substâncias Aparentadas

3.3.1.8.3. Conclusão

Os resultados obtidos das alterações feitas no ensaio da robustez revelaram que o ensaio é robusto cumprindo com os critérios de aceitação.

3.3.2. Substâncias Aparentadas de Lumefantrina

O Arteméter é o analito que contribui com maior percentagem de impurezas, por isso foi selecionada a validação do método de substâncias aparentadas do Arteméter. De modo a comprovar esta afirmação, foi realizada a análise da especificidade e os testes de *stress* para o método de substâncias aparentadas da Lumefantrina.

3.3.2.1. Especificidade

3.3.2.1.1. Critérios de aceitação

- Não devem aparecer picos a interferir com o pico de ativo.

3.3.2.1.2. Resultados

De seguida encontram-se os cromatogramas obtidos (da figura 3.64 à 3.68), correspondentes às injeções feitas no sistema cromatográfico para o ensaio da especificidade.

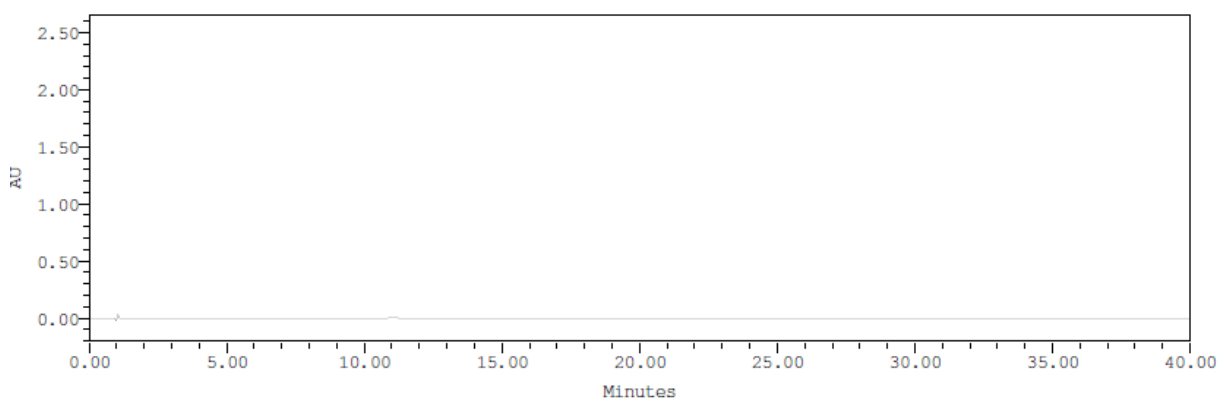


Figura 3.64. Cromatograma solvente de Lumefantrina – Substâncias Aparentadas

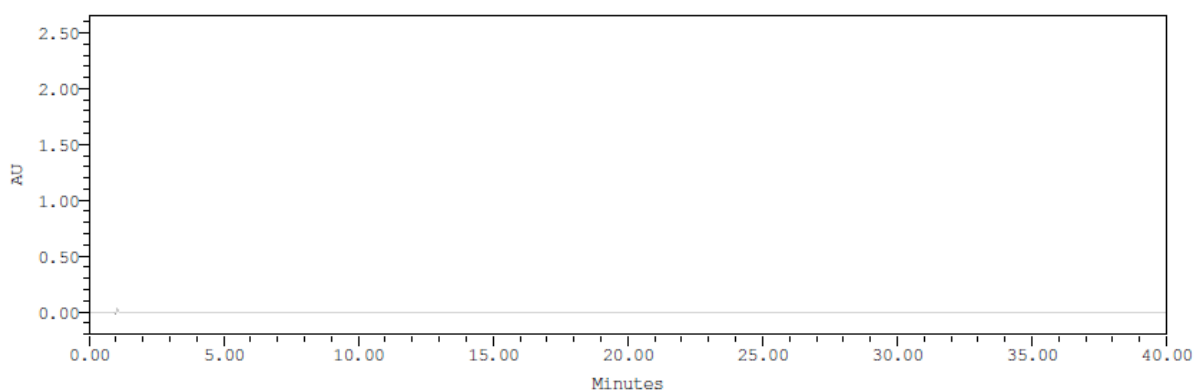


Figura 3.65. Cromatograma placebo de Lumefantrina – Substâncias Aparentadas

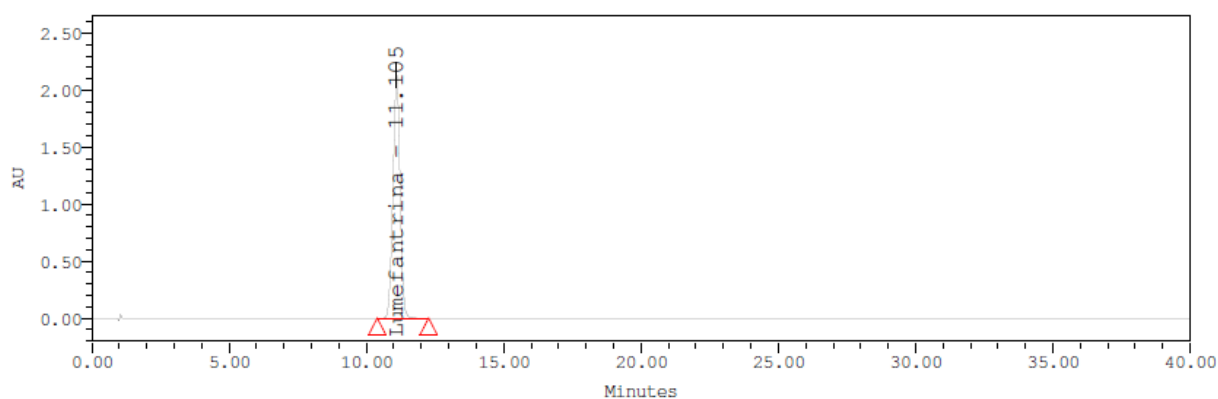


Figura 3.66. Cromatograma padrão 100% de Lumefantrina – Substâncias Aparentadas

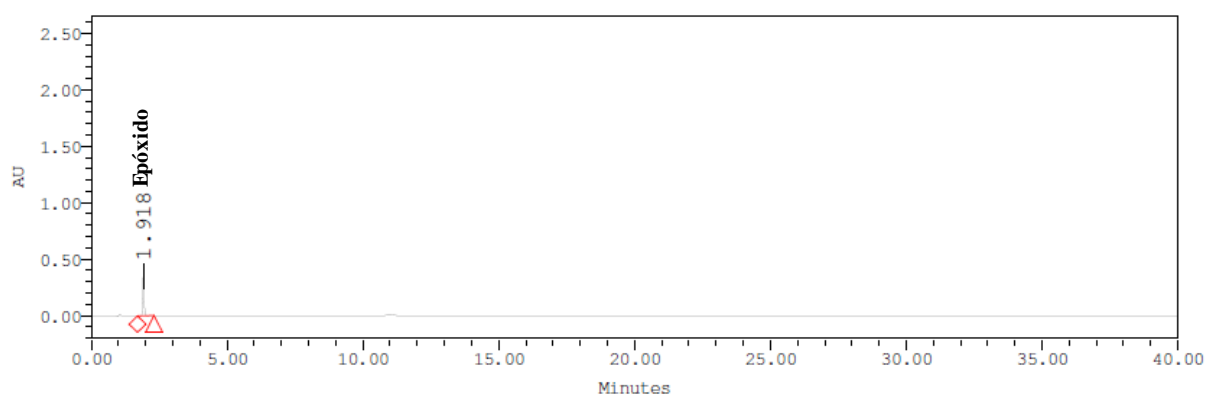


Figura 3.67. Cromatograma padrão de Epóxido – Substâncias Aparentadas

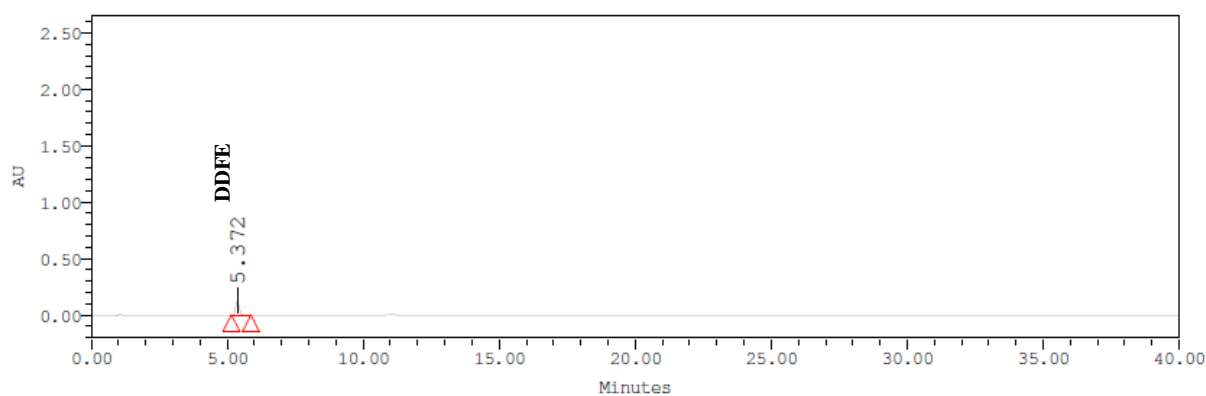


Figura 3.68. Cromatograma padrão de DDFE – Substâncias Aparentadas

3.3.2.1.3. Conclusão

Pela análise dos cromatogramas das soluções injetadas, concluiu-se que não existe interferências entre os picos.

3.3.2.2. Testes de Stress

Na tabela 3.58 estão os resultados dos testes de stress de lumefantrina, seguida dos cromatogramas obtidos (da figura 3.69 à 3.74) das injeções dessas soluções.

3.3.2.2.1. Resultados

Tabela 3.58. Resultados de testes de stress de Lumefantrina - Substâncias Aparentadas

TESTES DE STRESS					
Testes		Identificação dos picos (T. de Retenção) (min)			Área de Lumefantrina (mAU.s)
		Epóxido	DDFE	Lumefantrina	
S/ataque_T0		N.D	N.D	11.055	32251705
S/ataque_T24		N.D	N.D	11.116	32251705
HCL_T0		1.186	N.D	10.562	4440204
HCL_T24		1.19	N.D	10.569	55176052
NaOH_T0		N.D	N.D	11.055	25802646
NaOH_T24		N.D	N.D	11.102	26002790
Peróxido_T0		0.977	N.D	11.069	4072751
Peróxido_T24		0.977	N.D	11.111	30928791
Calor_T0	24h	N.D	N.D	11.079	33781272
	48h	N.D	N.D	11.074	31719710
	5dias	N.D	N.D	11.079	31969915
Luz_T0	24h	N.D	N.D	11.082	32533418
	48h	N.D	N.D	11.083	32515187
	5dias	N.D	N.D	11.084	32229791
Calor_T24	24h	N.D	N.D	11.118	34315600
	48h	N.D	N.D	11.112	32146779
	5dias	N.D	N.D	11.114	32109699
Luz_T24	24h	N.D	N.D	11.121	32767408
	48h	N.D	N.D	11.126	32430370
	5dias	N.D	N.D	11.125	32206796

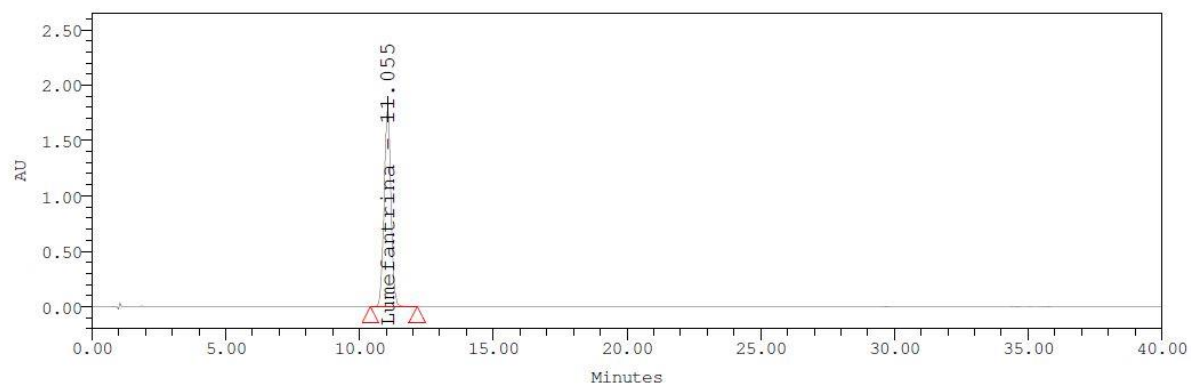


Figura 3.69. Cromatograma s/ataque t_0 de Lumefantrina – Substâncias Aparentadas

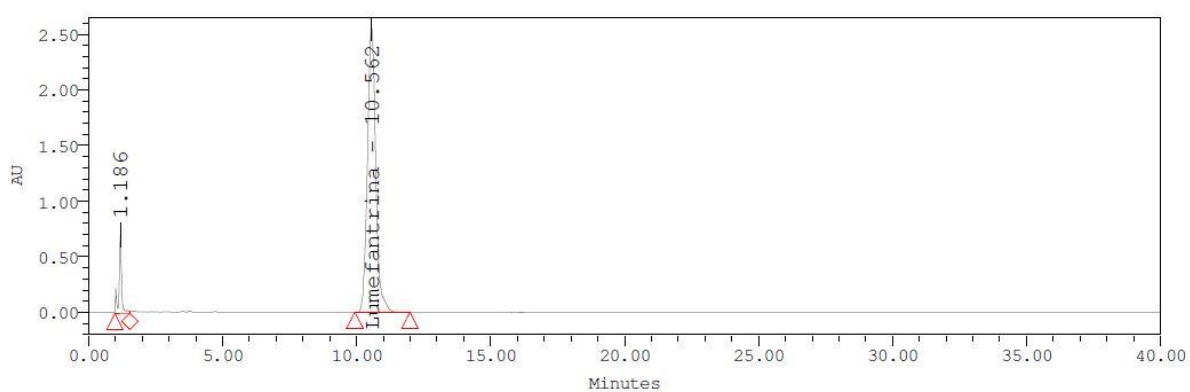


Figura 3.70. Cromatograma stress ácido t_0 de Lumefantrina - Substâncias Aparentadas

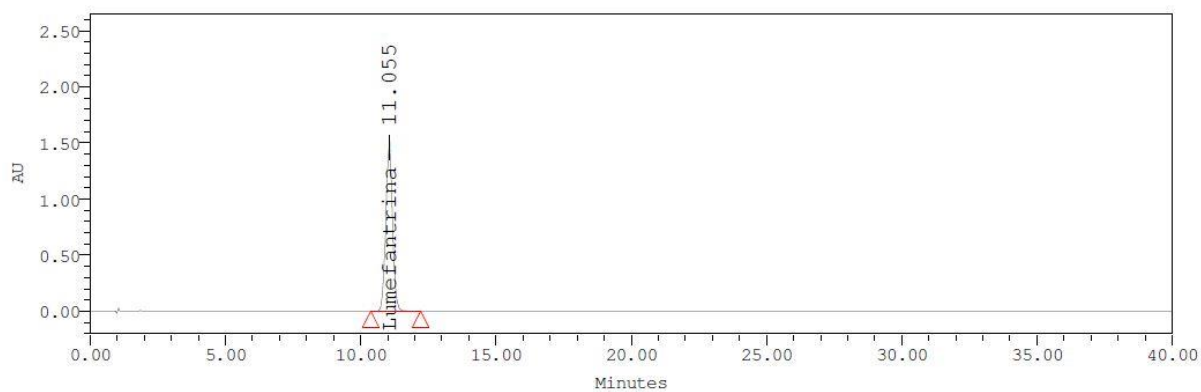


Figura 3.71. Cromatograma stress básico t_0 de Lumefantrina - Substâncias Aparentadas

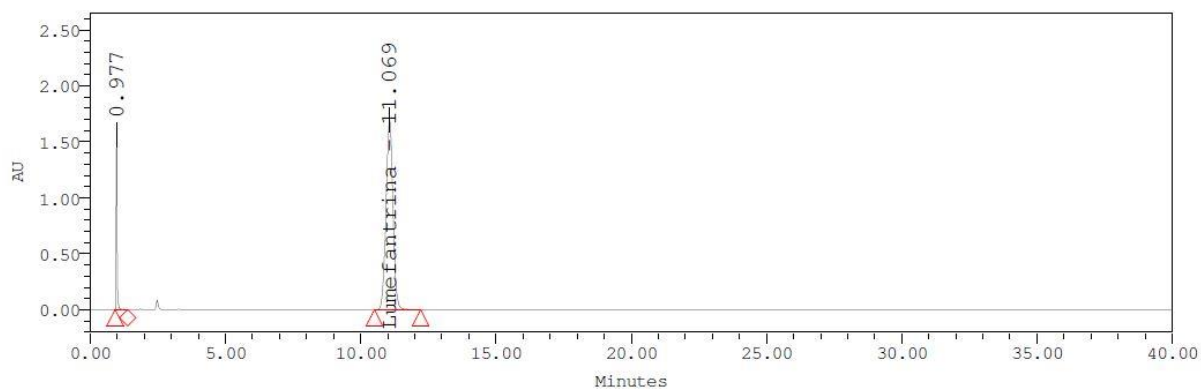


Figura 3.72. Cromatograma stress oxidação t_0 de Lumefantrina - Substâncias Aparentadas

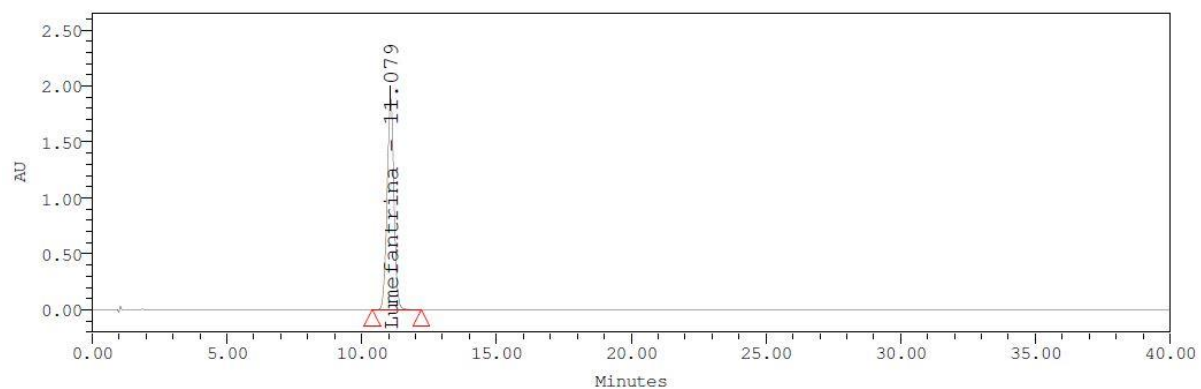


Figura 3.73. Cromatograma stress calor 24 horas t_0 de Lumefantrina – Substâncias Aparentadas

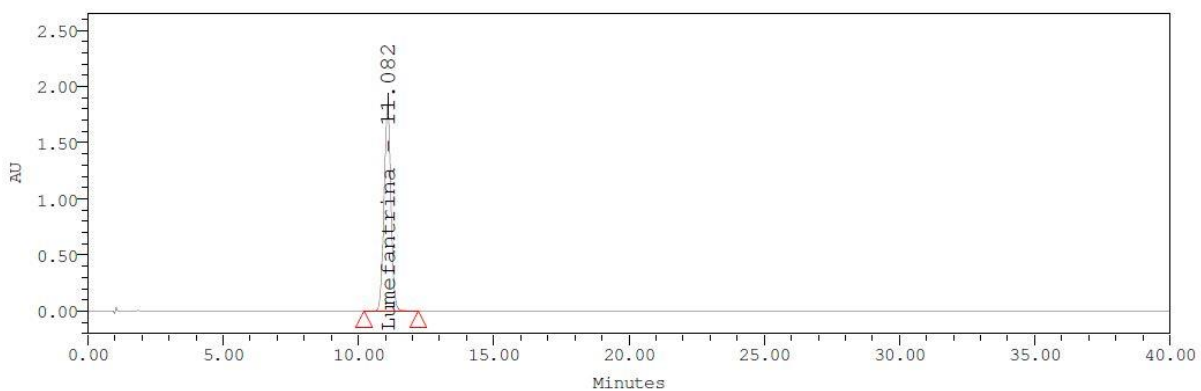


Figura 3.74. Cromatograma stress luz 24 horas t_0 de Lumefantrina – Substâncias Aparentadas

3.3.2.2. Conclusão

Os resultados obtidos dos testes de *stress* indicam que, em comparação com a amostra sem ataque, o ativo sofre uma ligeira degradação ácida e oxidativa, onde é detetada a presença da impureza Epóxido. Quando exposto às outras condições de *stress*, não se verificam alterações significativas em relação à amostra sem ataque.

A partir dos resultados obtidos, foi possível validar os dados da literatura. A Lumefantrina ao sofrer degradação não contribui com degradantes que sejam visíveis no método cromatográfico estudado. Por isto, na tese, devido ao tempo limitado, foi dada uma importância maior ao método de pesquisa de impurezas do Arteméter pois é o ativo que ao sofrer degradação contribui com maior percentagem de degradantes para a análise do comprimido.

4. CONCLUSÕES

Concluiu-se, assim, que todos os métodos analíticos testados foram validados, ou seja, o método do Doseamento é específico, linear, exato, preciso, robusto e estável, não apresentando nenhuma interferência nos parâmetros estudados.

Para o método da Dissolução foram utilizadas condições diferentes para a análise de ambos os ativos, tendo o Arteméter demonstrado menor robustez para com as alterações efetuadas ao método, e o facto de não ser estável para o tempo de estudo da solução. Para os outros parâmetros, os resultados foram satisfatórios e, consequentemente, validados.

O método das Substâncias Aparentadas foi estudado, de acordo com a literatura, para o Arteméter que apresenta uma maior percentagem de impurezas no método. Tal foi verificado, aquando da comparação com o ensaio dos testes de *stress* feitos a este método entre o Arteméter e a Lumefantrina. Confirmou-se, de facto, um maior aparecimento das impurezas de Arteméter. Este método demonstrou ser específico, linear na gama de concentrações estudada, tendo-se determinado o limite de quantificação de 0,1%, exato, preciso e robusto. Na tabela 4.1 está o resumo da validação analítica:

Tabela 4.1. Resumo da Validação Analítica

	Doseamento		Dissolução		Substâncias Aparentadas	
	Arteméter	Lumefantrina	Arteméter	Lumefantrina	Arteméter	Lumefantrina
Especificidade	Não existem compostos que interfiram com os picos das substâncias ativas					
Testes de Stress	N.A	N.A	N.A	N.A	Degradações significativas	Degradações pouco significativas
Linearidade	r = 0,997	r = 0,999	r = 0,995	r = 0,999	r = 0,998	N.A
	Teste Fisher satisfatório		Teste Fisher satisfatório		Teste Fisher satisfatório	
	Y-interseção compatível com valor 0		Y-interseção compatível com valor 0		Y-interseção compatível com valor 0	
Exatidão	%Recuperação média = 100,9	%Recuperação média = 99,5	%Recuperação média = 89,84	%Recuperação média = 102,98	%Recuperação média = 99,94	
Precisão do Sistema	%RSD = 0,90	%RSD = 0,02	%RSD=1,36	%RSD=0,32	%RSD=3,44	
Precisão	Coeficiente repetibilidade = 1,79	Coeficiente repetibilidade = 1,43	Coeficiente repetibilidade = 2,61	Coeficiente repetibilidade = 0,45	Coeficiente repetibilidade = 3,89	
	Coeficiente Precisão	Coeficiente Precisão	Coeficiente Precisão	Coeficiente Precisão	Coeficiente Precisão	
	Intermédia = 2,25	Intermédia = 2,08	Intermédia = 2,98	Intermédia = 1,33	Intermédia = 4,14	
Limite de quantificação	N.A	N.A	N.A	N.A	Para Concentração = 0,1% %RSD=6,93	
Robustez	Robusto perante todas as alterações ao método		Não é robusto para alterações de pH, de temperatura da coluna e de filtro para GF/C	Robusto perante todas as alterações ao método	Robusto perante todas as alterações ao método	

Estabilidade	Estável até pelo menos 30h	Instável para as primeiras 10 horas estudadas	Estável até pelo menos 30h	N.A
--------------	----------------------------	---	----------------------------	-----

Verificou-se, com uma validação de processo do lote de arranque produzido na *SOFARIMEX – Industria Química e Farmacêutica, S.A.*, que os métodos validados são aplicáveis, como se observa na tabela 4.2:

Tabela 4.2. Resultados obtidos da validação de processo

Métodos	Ativos	Mistura	Comprimidos	Critérios de Aceitação	
Doseamento (%)	Arteméter	96,6	93,1	90 - 110	
	Lumefantrina	90,8	96,6		
Dissolução (%)	Arteméter	-	101,0	>65	
	Lumefantrina	-	94,47	>60	
Substâncias Aparentadas (%)	Arteméter	Impurezas conhecidas	-	<0,1	<0,3
		Impurezas desconhecidas	-	<0,1	<0,2
	Lumefantrina	Impurezas desconhecidas	-	<0,1	<0,2

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Aiache, J. M., Aiache, S. e Renoux, R. (1998). *Iniciação ao conhecimento do medicamento*. São Paulo, Andrei.
- [2]. Azevedos, G. (2016). *Especialista em Liofilizados*. Disponível em http://www.grupoazevedos.com/atividade/producao/especialista_em_liofilizados [consultado em 10/04/2017]
- [3]. Azevedos, G. (2016). *Grupo Azevedos*. Disponível em <http://www.grupoazevedos.com/> [consultado em 10/04/2017]
- [4]. Azevedos, G. (2016). Sofarimex. Disponível em <http://www.grupoazevedos.com/atividade/producao/> [consultado em 10/04/2017]
- [5]. Barbosa, E. (2001). RDC 33 sob fogo cruzado. *Pharmacia Brasileira*, 13–16.
- [6]. BioPharm. (2017). Assay Development and Method Validation Essentials. Disponível em <http://www.biopharminternational.com/assay-development-and-method-validation-essentials> [consultado em 22/03/2017]
- [7]. Castro, A., & Cabrita, L. (2000). *Guia RELACRE 13 Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*. Lisboa, RELACRE.
- [8]. Chasin, A. A. M., Nascimento, E. S., Ribeiro-Neto, L. M., Siqueira, M. E. P. B., Andraus, M. H., Salvadori, M. C., e Fernícola, N. A. G. (1998). Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. *Revista Brasileira de Toxicologia*, 11(2), 1–6.
- [9]. Collins, C. H. (1997). Princípios básicos da cromatografia. In Collins, C. H. *Introdução a métodos cromatográficos*. São Paulo, UNICAMP. cap. I, p. 11–27.
- [10]. Davidson, R. (2004). *Ensaio de Farmacotecnica*. Disponível em http://www.infarmed.pt/pt/noticias_eventos/eventos/ev_11_10_2004/apresentacoes/Tarde/Ricardo_Davidson.pdf [consultado em 04/04/2017]
- [11]. Degani, A. L. G., Cass, Q. B., & Vieira, P. C. (1998). Cromatografia: Um breve ensaio. *Atualidades Em Química*. 7(7), p. 21–25.
- [12]. Dutra de Oliveira, J. E. (1989). Deficiências Energéticas no Brasil. *World Sugar Research Organisation*, 25 (2) p. 11–12.
- [13]. EDOL. (2016). Controle e Garantia da Qualidade. Disponível em <http://edol.pt/servicos/controle-e-garantia-da-qualidade/> [consultado em 25/03/2017]
- [14]. Gennaro, A. (2004). *A ciência e a prática da farmácia*. São Paulo, Guanabara-Koogan.
- [15]. Guimarães, L. F. L., e Collins, C. H. (1997). Cromatografia líquida de alta eficiência. In Guimarães, L. F. L., e Collins, C. H. *Introdução a métodos cromatográficos*. São Paulo, UNICAMP. cap. I, p. 183–238

- [16].Huber, L. (2010). Validation of Analytical Methods. *Agilent Technologies*. 2(1), p. 1–65.
- [17].ICH. (2005). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. Disponível em https://doi.org/http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf [consultado em 29/03/2017]
- [18].Infarmed. (2016). *Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P.* Disponível em <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/apresentacao> [consultado em 10/04/2017]
- [19].Isse, K. F. (2011). *A indústria farmacêutica nacional e a importância dos medicamentos genéricos no seu desenvolvimento*. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- [20].Jorge, A. (2006). O Mundo da Indústria Farmacêutica em suas mãos. Disponível em http://www.garantiadaqualidade.com.br/controle_qualidade [consultado em 05/04/2017]
- [21].Kesič, D. (2009). Strategic analysis of the world pharmaceutical industry. *Journal of Contemporary Management Issues*. 14(1), p. 59–76.
- [22].Lachman, L., Liberman, H. A., & Kanig, J. L. (2001). *Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.
- [23].Lanças, F. M. (1993). *Cromatografia em fase gasosa*. São Paulo, ACTA.
- [24].Lee, Y. C., e Zhang, X.-M. (2004). Method Validation for HPLC Analysis of Related Substances in Pharmaceutical Drug Products. *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*. 3(2), p. 27–49.
- [25].Leite, F. (2008). *Validação em Análise Química*. Rio de Janeiro, Átomo.
- [26].LSS. (2009). Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2(5), p. 8 - 15
- [27].Maheshbhai, P. B. (2012). *Development and Validation of Analytical Method for Quantitative Estimation of Artemether and Lumefantrine in Combined dosage*. Tese de Mestrado, Rajiv Gandhi University of Health Sciences.
- [28].McPolin, O. (2009). *Validation of Analytical Methods for Pharmaceutical Analysis*. Warrenpoint, Mourne Training Services.
- [29].Neto, F. R. A., & Nunes, D. S. S. (2003). *Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins*. Rio de Janeiro, Interciência
- [30].Pereira, J. (2008). *Caracterização e Validacao de Metodos Analíticos*. Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra.
- [31].Pinto, T. J. A., Kaneko, T. M., & Ohara, M. T. (2003). *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. São Paulo, Atheneu.

- [32]. Ribani, M., Grespan Bottoli, C. B., Collins, C. H., Fontes Jardim, I. C. S., & Costa Melo, L. F. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*. 27(5), p. 771–780.
- [33]. Santoro, M. I. R. M. (1998). *Introdução ao controle de qualidade de medicamentos*. São Paulo, Atheneu.
- [34]. Skoog, D. A., Crouch, S. J., e Holler, F. J. (2009). *Princípios de Análise Instrumental*. Porto Alegre, Bookman.
- [35]. Taylor, J. K. (1987). *Quality assurance of chemical measurements*. Flórida, CRC Press.
- [36]. Thomas, M. J. K., Menham, J., Denney, R. C. e Barnes, J. D. (2002) *Vogel - Análise Química Quantitativa*. Rio de Janeiro, Livros Téc. e Cient. Editora

ANEXOS

- A. Descrição do Método de Doseamento (Confidencial - método descrito nos procedimentos internos da empresa)
- B. Descrição do Método de Dissolução de Arteméter (Confidencial - método descrito nos procedimentos internos da empresa)
- C. Descrição do Método de Dissolução de Lumefantrina (Confidencial - método descrito nos procedimentos internos da empresa)
- D. Descrição do Método de Substâncias Aparentadas e Estudos de Stress de Arteméter (Confidencial - método descrito nos procedimentos internos da empresa)
- E. Descrição do Método de Substâncias Aparentadas de Lumefantrina (Confidencial - método descrito nos procedimentos internos da empresa)